

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 1 9 9 9 年 1 1 月 2 9 日  
Date of Application:

出 願 番 号 平成 1 1 年 特 許 願 第 3 3 8 8 4 1 号  
Application Number:

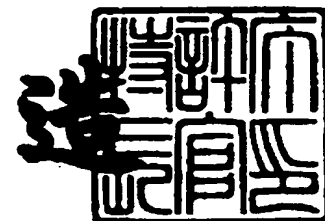
出 願 人 寒 川 賢 治  
Applicant (s):

Best Available Copy

2 0 0 1 年 2 月 2 0 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



【整理番号】DS03J105

【提出日】平成11年11月29日

【あて先】特許庁長官 殿

【国際特許分類】

C07K 14/60

C12N 15/16

【発明者】

【住所又は居所】大阪府箕面市小野原東6丁目28、4-201号

【氏名】寒川 賢治

【発明者】

【住所又は居所】大阪府豊中市西緑丘1丁目5-1、302号

【氏名】児島 将康

【発明者】

【住所又は居所】大阪府箕面市西宿2丁目12-12、藤和箕面ホームズA808号

【氏名】細田 洋司

【発明者】

【住所又は居所】兵庫県神戸市東灘区西岡本6丁目4-24、204号

【氏名】松尾 壽之

【特許出願人】

【識別番号】593081475

【氏名又は名称】寒川 賢治

【代理人】

【識別番号】100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】岩谷 龍

【電話番号】06-4796-1300

【先の出願に基づく優先権の主張】

【出願日】平成11年 7月23日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 066372

【納付金額】 21,000

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

——【請求項2】—— 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列において少なくともアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む請求項1記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項3】 配列番号3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22および23記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する請求項2記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項4】 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有し、(1)構成アミノ酸が修飾されているか又はされていない、かつ(2)少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換されているか又はされていないペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項5】 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列において少なくともアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む請求項4記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項6】 配列番号3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22および23記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する請求項4乃至5記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

る請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 8】 修飾されたアミノ酸におけるアミノ酸がセリン又はシステインであることを特徴とする請求項 7 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 9】 アミノ酸の  $\alpha$  炭素に、(1) 炭素数 1 以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミド結合を介して炭素数が 1 若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(2) H 又は炭素数 1 以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸を含有する請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 10】 エステル結合により修飾された修飾アミノ酸を有する請求項 1 乃至 6 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 11】 脂肪酸が結合したアミノ酸を有する請求項 10 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 12】 炭素数が 2 乃至 35 である脂肪酸が結合したアミノ酸を有する請求項 11 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 13】 炭素数が 2、4、6、8、10、12、14、16 および 18 の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸が結合したアミノ酸を有する請求項 12 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 14】 結合した脂肪酸がオクタン酸(octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求項 13 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 15】 結合した脂肪酸がデカン酸(decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求項 13 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 16】 N 末端が炭素数 1 以上の飽和あるいは不飽和アルキル又はアシル基により修飾され及び／又は C 末端のカルボキシル基の OH が OZ 又は NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub> (Z は薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基、R

互いに同一又は異なる基を示す)であることを特徴とする請求項1乃至15項記載のペプチド系化合物。

【請求項17】 請求項1乃至16記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物。

【請求項18】 請求項1乃至16記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物。

【請求項19】 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、請求項1乃至16記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる当該疾患を治療するための医薬組成物。

【請求項20】 ヒト以外の動物に適用するための請求項17乃至19記載の医薬組成物。

【請求項21】 請求項1乃至16記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法。

【請求項22】 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、請求項1乃至16記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる当該疾患の治療方法。

【請求項23】 ヒト以外の動物に適用するための請求項21乃至22記載の治療方法。

【請求項24】 請求項1乃至16記載のペプチド系化合物に係るDNAであって、当該DNAの塩基配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする塩基配列を有する当該DNA。

【請求項25】 配列番号6、7、14、15、20、21および24記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列を有する請求項24記載のDNA。

【請求項26】 配列番号6、7、14、15、20、21および24記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列のうち、アミノ酸をコードし

【請求項 27】 請求項 24 乃至 26 記載の DNA を有するベクター。

【請求項 28】 請求項 27 記載のベクターを含有する細胞。

【請求項 29】 請求項 24 乃至 26 記載の DNA を有するベクターを有し、且つ当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されたペプチド系化合物として産生することができる細胞。

【請求項 30】 請求項 1 乃至 16 記載のペプチド系化合物に対する抗体。

【請求項 31】 請求項 30 記載の抗体を用いて請求項 1 乃至 16 記載のペプチド系化合物を同定することを特徴とする当該ペプチド系化合物のアッセイ方法。

【請求項 32】 請求項 30 記載の抗体を用いて請求項 1 乃至 16 記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする当該ペプチド系化合物の検出用キット。

【請求項 33】 請求項 1 乃至 16 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、請求項 24 乃至 26 記載の DNA を含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる当該方法。

【請求項 34】 請求項 1 乃至 16 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、請求項 24 乃至 26 記載の DNA を含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする当該方法。

【請求項 35】 請求項 11 乃至 15 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、配列番号 8 記載のアミノ酸配列中のセリン残基に脂肪酸が結合したペプチドとして産生することができる細胞を用いることを特徴とする製造方法。

【請求項 36】 請求項 4 乃至 6 記載のペプチド系化合物をコードする DNA

して培養物から目的物質を採取することを行徴とする、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチド系化合物の製造方法。

【請求項 37】 請求項 1 乃至 16 記載のペプチド系化合物をコードする DNA を含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより、成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物。

【請求項 38】 請求項 1 乃至 16 記載のペプチド系化合物をコードする DNA を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法。

【請求項 39】 請求項 1 乃至 16 記載のペプチド系化合物をコードする DNA を含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物。

【請求項 40】 請求項 1 乃至 16 記載のペプチド系化合物をコードする DNA を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明を詳細に説明するに先立ち、用語を以下のように定義する。ペプチドと



アミノ酸がペプチド和に置換された化合物のことをいふ。アミノ酸とは、アミノ酸の一般式； $\text{NH}_2\text{-CH(R')-COOH}$ において、 $\text{R'}$ が天然に存在する置換基を有する天然アミノ酸、当該置換基がさらに修飾された修飾アミノ酸及びそのD,L-光学異性体ばかりではなく、例えば上記一般式において、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドを介して様々な置換基が結合した非天然アミノ酸も含む。ペプチド類縁体とは、ペプチドにおいて少なくとも1つのアミノ酸が非アミノ酸化合物で置換された化合物のことをいい、従って当該置換化合物のペプチド類縁体への少なくとも1つの結合はペプチド結合ではない。また、これらペプチド及びペプチド類縁体のアミノ末端及び／又はカルボキシル末端が修飾された化合物を誘導体とし、ペプチド、ペプチド類縁体及びそれらの誘導体を総称してペプチド系化合物とした。

### 【0002】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、ペプチド中のアミノ酸が修飾されていることを特徴とした、細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用あるいは成長ホルモンの分泌誘導活性を有する新規ペプチドに関する。本願発明はまた、当該新規ペプチドの取得方法及び製造方法、該ペプチド及び該ペプチドの前駆体をコードする遺伝子、及び当該遺伝子を用いた該ペプチドの製造方法に関する。さらに本願発明は、本願発明により開示された新規修飾ペプチドの構造類似体で、成長ホルモン分泌誘導化合物のレセプターに結合して細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用あるいは成長ホルモンの分泌誘導活性を有するペプチド類縁体及びその製造方法に関する。本願発明はまた、該ペプチド及び該ペプチド類縁体を有効成分とする医薬用組成物、動物用成長促進剤、及び該ペプチドの抗体及びその利用方法に関する。

### 【0003】

#### 【従来の技術】

成長ホルモン（growth hormone、以下単にGHと略称する）は、下垂体前葉で合成されるタンパク質ホルモンで、骨の成長及び脂肪細胞や軟骨細胞の分化を間接的に促進し、その分泌は、成長ホルモン放出ホルモン（GHRH; growth hormone-releasing hormone）で促進され、ソマトスタチン（somatostatin）で阻害される

【0004】

ヒトGHが遺伝子組換え技術によって生産されるようになって以来、GHは上記小人症の治療 [J. O. Jorgensen, Endocr. Rev. 12, 189 (1991)] だけでなく、他の疾患の治療にも用いられ、様々な効果が見いだされた [J. O. Jorgensen, et al., Horm. Res. 42, 235 (1994)]。例えば、正常人での骨芽細胞及び骨再構成の活性化 [K. Brixen, et al., Miner. Res. 5, 609 (1990)]、GH欠乏症成人での筋肉量及び筋力の増強 [R. C. Cuneo, et al., J. Appl. Physiol. 70, 688 (1991)]、GH欠乏症成人での運動能力の向上 [R. C. Cuneo, et al., J. Appl. Physiol. 70, 695 (1991)]、小児の重度火傷治癒 [D. N. Herndon, et al., Ann. Surg. 212, 424 (1990)]、排卵誘発におけるゴナドトロピンとの併用 [R. Homburg, et al., Clin. Endocrinol. (Oxf). 32, 781 (1990)]、プレドニゾン投与によるタンパク質代謝異常の予防 [F. F. Horber and M. W. Haymond, J. Clin. Invest. 86, 265 (1990)]、重度免疫不全症におけるT細胞「教育」の促進 [W. J. Murphy, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 4481 (1992)]、老人性の体重減少、脂肪組織拡大及び皮膚萎縮を抑制する効果 [D. Rudman, et al., N. Engl. J. Med. 323, 1 (1990)] などがある。

【0005】

小児の成長促進、及び成人のGH欠乏に伴う代謝や機能の欠損の正常化に、組換えGHの投与は効果的ではあるが、用量限定的な副作用があること、経口投与ができないこと及びコスト面で問題がある [B. A. Lefker, et al., in Growth Hormone Secretagogues in Clinical Practice, B. B. Bercu and R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998), p. 107-p. 108]。多くの成人患者は、過剰なナトリウムと体液の貯留によると思われる関節痛や手根管症候群のよ

001-03-2001  
00946453-199909-01  
【00005】  
Proc. Rev. 14, 20 (1993)】。これらの副作用は、GH投与によるホルモン分泌の非生理的なパターンと関係しており、GHの投与では正常なGH分泌の拍動性 (pulsatility) をまねることができない [B. A. Lefker, et al., in Growth Hormone Secretagogues in Clinical Practice, B. B. Bercu and R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998), p.107-p.108]。

#### 【0006】

生体内でのGH分泌の拍動性は、基本的には視床下部由来の2つの制御因子の相互作用によって確立される、すなわちGHRHとソマトスタチンが下垂体に作用してGH分泌を制御している [G. S. Tannenbaum and N. Ling, Endocrinology 115, 1952 (1984), R. G. Clark and I. C. Robinson, Endocrinology 122, 2675 (1988)]。正常なGH分泌のパターンは昼夜で異なり、夜間に、より多くのGHがより頻繁に放出される。GHの放出パルスの振幅は、種々のステロイド・ホルモン、神経伝達物質、GHとインシュリン様成長因子によるフィードバック、栄養状態、睡眠及び運動によって、さらに調節される [J. S. Strobe and M. J. Thomas, Pharmacol. Rev. 46, 1 (1994)]。

#### 【0007】

上に記載したGH投与に伴う副作用を克服するために、GH分泌誘導活性を有する化合物が数多く合成され、GH分泌誘導物質 (GHS; growth hormone secretagogue) としてその構造活性相関、薬理学、臨床応用が精力的に研究された。まず、GHRP-6 (Growth Hormone-Releasing hexapeptide) などのペプチドが合成され、GHの欠損ないしは低下に起因する治療薬として開発された [C. Y. Bowers, et al., Endocrinology 114, 1537-1545 (1984)]。しかし、これらのペプチド化合物は静脈注射でしか効果を発揮できないので、経口投与可能な低分子量の非ペプチド系化合物が開発され [R. G. Smith, et al., Science 260, 1640-1643 (1993)]、第二相臨床試験の段階にまで進んでいるものもある [A. A. Patchett, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 7001-7005 (1995)]。

#### 【0008】

細胞における、レセプターのシグナル受容から機能発現に至るまでの一連の情

信号伝達系（signal transduction）というが、Gタンパク質と共役したシグナル伝達系は以下のような機構で進行する [八杉龍一ら編, 岩波生物辞典第4版 (岩波書店, 東京, 1997), 555-556頁]。このGタンパク質共役系は細胞膜7回貫通型レセプターをもち、cAMPをセカンドメッセンジャーとして産生するcAMP系とイノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP3) やジアシルグリセロール (DG) イノシトールリン脂質情報伝達系に分けられる。cAMPはcAMP依存性のキナーゼ (Aキナーゼ) を活性化し、機能タンパク質のセリンやスレオニン残基のリン酸化を起こし、活性を修飾する。一方、IP3は小胞体上のIP3受容体と結合し、カルシウムイオンの遊離を促し、DGはCキナーゼを活性化してホルモンなどの作用発現を促す。

### 【0009】

IP3やDGをセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達系で、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する機構は以下の如くである [J. Kendrew, et al., Eds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p.136-137]。レセプターヘリガンドが結合すると、Gタンパク質を介してホスホリパーゼCが活性化されて、PIP2からIP3が生成する。IP3は細胞内顆粒であるERなどの小胞体に貯蔵されているカルシウムイオンを細胞質に放出させ、細胞質中のカルシウムイオン濃度が上昇する。IP3もしくはカルシウムイオンがさらに細胞質に存在すると、カルシウムは再び小胞体に取り込まれ、細胞質中のカルシウムイオン濃度は低下する。すなわち、レセプターへのリガンドの結合は、細胞質中のカルシウムイオン濃度の一過性の上昇をもたらす。

### 【0010】

GHSはGHRHによるGHの分泌及び細胞内cAMPレベルの上昇に協奏的に作用すること [K. Cheng, et al., Endocrinology 124, 2791-2798 (1989)]、及びGHRHのレセプターへの結合はcAMPをセカンドメッセンジャーとして産生するのに対して、GHSは細胞内カルシウムイオン濃度の上昇をもたらすことから、GHSの作用機作はGHRHのそれとは異なることが示唆され [J. Herrington and B. Hille, Endocrinology 135, 1100-1108 (1994).]、GHSはGHRHが結合するGHRHレセプターとは異なるレセプターに結合することが想定された。実際にGHSが結合するレセプター

遺伝子がクローニングされ、ノサン豚の脳下垂体からGHSレセプター（GHS-R）が発見された。豚の脳下垂体及び脳下垂体で発現していること、及びブタとヒト由来のGHS-Rのアミノ酸配列が90%以上の同一性を示すことがわかった [A. D. Howard, et al., Science 273, 974-977 (1996)]。しかし、GHS-Rに結合する内在性のリガンドは単離されておらず、このGHS-Rはリガンドが不明なオーファン・レセプターであった。

### 【0011】

タンパク質のアミノ末端、又はタンパク質を構成するアミノ酸残基の側鎖に、ミリスチン酸、ゲラニル酸、パルミトイル酸、ファルネシル酸などの脂肪酸が結合することがあるが、これらの脂肪酸の役割はこれらの脂肪酸修飾タンパク質を細胞膜にアンカーリング（anchoring）することにある [J. Kendrew, et al., Eds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p. 616]。これらの脂肪酸修飾タンパク質において、脂肪酸はシステイン残基にS-アシル結合で結合しており、本願発明によって開示された内在性のGHSのようにセリン残基にO-アシル結合で脂肪酸が結合したアミノ酸、この脂肪酸修飾アミノ酸を含むタンパク質及びペプチドは全く知られていなかった。また、脂肪酸で修飾されたアミノ酸を含むペプチドが、いかなるレセプターのリガンドとして機能することも知られていなかった。

### 【0012】

#### 【発明が解決しようとする課題】

GHSレセプターに結合して細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるか、又はGH分泌を誘導する活性を有する内在性のリガンド、すなわち内在性GHSの発見及び利用方法が所望されていた。さらに、当該内在性GHSの構造類似体で、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるか、又はGH分泌誘導活性を有する化合物が望まれていた。また、当該内在性GHS又はその構造類似化合物を含有し、GHの拍動的な分泌を誘導することによってGH投与による副作用のない医薬組成物あるいは動物の成長を促進するための組成物、及び当該組成物を用いた治療方法が所望されていた。

### 【0013】

本願発明者らは、GHSレセプター（GHS-R）へのリガンドの結合がイオントロープリン脂質をセカンドメッセンジャーとして細胞内カルシウムイオン濃度の一過性の上昇をもたらすことに着目し、GHS-Rを発現させたCHO細胞（CHO-GHSR62）において細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性（Ca上昇活性）を指標に、各種臓器又は組織の抽出物をスクリーニングした。その結果、ラット胃の抽出物に強いCa上昇活性があることを見だし、当該抽出物より各種クロマトグラフィーを用いてCa上昇活性を有する物質を精製して、該物質が脂肪酸で修飾された分子量約3,000の新規ペプチドであることを見出した。さらに当該新規ペプチドが、下垂体前葉細胞からのGHの特異的な分泌を促進することを確認して、該新規ペプチドがGHS-Rの内在性のリガンド、すなわち内在性GH分泌誘導物質（内在性GHS）であることを見出した。すなわち、本願発明の第一は、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性又はGH分泌誘導活性を有し、構成アミノ酸残基が脂肪酸で修飾されていることを特徴とする内在性のGH分泌誘導ペプチド、及び該ペプチドの取得方法である。

## 【0014】

本願発明者らは、該内在性GH分泌誘導ペプチドの構造を詳細に解析し、該ペプチドが配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであり、アミノ末端から3番目のセリン側鎖の水酸基が脂肪酸でアシル化されていることを見出した。またラットと同様、強いCa上昇活性が存在するヒト胃抽出物中からも、ラット由来のGH分泌誘導ペプチドと同様の方法で精製及び構造解析を行った結果、ヒト由来の内在性GH分泌誘導ペプチドも配列番号3に記載のアミノ酸配列からなり、アミノ末端から3番目のセリン側鎖の水酸基が脂肪酸でアシル化されていることがわかった。ラット及びヒト由来の内在性GH分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列を比較すると全体で89%の高い同一性を示した。より詳しくは、ラットとヒトではアミノ末端から10番目までのアミノ酸配列及び13～28番目のアミノ酸配列は同一であるが、11番目と12番目のアミノ酸もラットでリジン、アラニンであり、ヒトでこれらがそれぞれアルギニン、バリンに置換されていた。ラット由来の内在性GH分泌誘導ペプチドを各種プロテアーゼで切断し、精製したペプチド断片のCa上昇

下がCa上昇活性を有する最小のペプチドであった。

### 【0015】

さらに、化学合成したペプチドのCa上昇活性の測定などから、Ca上昇活性発現に必須のコア配列は配列番号8に記載の4アミノ酸からなる配列であることがわかった。また、ラット以外のヒト、ブタ、ウシから分離した内在性GH分泌誘導ペプチド(28アミノ酸)およびこれらのペプチドから1つグルタミンが欠失した内在性GH分泌誘導ペプチド(27アミノ酸)のいずれににおいても、配列番号9に記載の10アミノ酸からなる配列が保存されていた。すなわち、本願発明の第2は、配列番号8に記載のアミノ酸配列、望ましくは配列番号1に記載のアミノ酸配列、より望ましくは配列番号9に記載のアミノ酸配列をCa上昇活性発現に必須のコア配列として含む脂肪酸修飾ペプチドである。

### 【0016】

本願発明によって開示されたGH分泌誘導活性をもつ内在性脂肪酸修飾ペプチド又は上記コア配列からなる脂肪酸修飾ペプチドは、Ca上昇活性を有する化合物の設計指針も提供する。すなわち、当該脂肪酸修飾ペプチドの構造類似化合物を合成し、該構造類似化合物のCa上昇活性を確認することにより、Ca上昇活性を有する新規化合物を取得することができる。従って、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチド又はペプチド類縁体において、構成アミノ酸が修飾アミノ酸又は非アミノ酸化合物で置換された化合物も本願発明に属することはいうまでもない。

### 【0017】

内在性GH分泌誘導ペプチドをコードするcDNAを常法により取得した。配列番号4及び5に記載したアミノ酸配列に示された如く、ラット及びヒトのcDNAはいずれも117アミノ酸からなり、アミノ末端から24番目ないし51番目まで28アミノ酸の配列がラット及びヒトの内在性GH分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列と各々一致した。すなわち、内在性GH分泌誘導ペプチドは117アミノ酸からなる前駆体ペプチドとして合成され、アミノ末端側の23アミノ酸からなるシグナルペプチドが切断を受け、さらにカルボキシル末端側の56アミノ酸が切断除去されてGH分泌誘導

らも28アミノ酸からなる内在性GH分泌誘導ペプチドの前駆体をコードするcDNAが見いだされた。従って、本願発明の第4は、内在性GH分泌誘導ペプチドの前駆体をコードするcDNA及び当該cDNAを用いたCa上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチド又はペプチド類縁体の原料となるペプチドの製造方法である。

# 【0018】

ラット胃抽出物から28アミノ酸で構成される内在性GH分泌誘導ペプチド（グレリン）を精製する際に、マイナー画分として回収されるペプチドを解析したところ、グレリンの13番目若しくは14番目のグルタミンが1つ欠失した27アミノ酸からなるペプチド（グレリン-27）を見いだした。グレリン-27は28アミノ酸からなるグレリンと全く同様のCa上昇活性およびGH分泌誘導活性を有しており、内在性のGH分泌誘導ペプチドであるから、該グレリン-27も本発明に属する。

# 【0019】

グレリンの13番目および14番目のグルタミンをコードしている塩基配列は、gca gcaでありmRNAのスプライシング（splicing）が起こるエクソンの末端の配列であり、異ったスプライシングが起こることにより、2つのグルタミンのコードのうち1つが脱落したcDNAが生成する可能性が示唆された。実際にラット及びヒトのcDNAライブラリーを探索したところ、27アミノ酸からなるグレリン-27の前駆体ペプチドをコードするcDNAが見つかった。すなわち、ラットおよびヒトのグレリン-27ペプチドは、配列番号12または13に記載した116アミノ酸からなる前駆体ペプチドとして合成され、アミノ末端側の23アミノ酸からなるシグナルペプチドが切断を受け、さらにカルボキシル末端側の56アミノ酸が切断除去されて27アミノ酸からなるGH分泌誘導活性をもつ脂肪酸修飾ペプチドとして生成することが明らかになった。また、ブタおよびウシからもグレリン-27ペプチドの前駆体をコードするcDNAが見いだされ、これらの動物においてもグレリン-27およびその前駆体の存在が確認された。すなわち、配列番号10、11、17および22記載のアミノ酸配列からなるグレリン-27ペプチド、及び配列番号12、13、19および22記載のアミノ酸配列を有するグレリン-27前駆体ペプチド、並びに配列番号14、15、21、および24に記載の塩基配列を有する該前



【0020】

本願発明で開示されたCa上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチド又はCa上昇活性を有するペプチド類縁体又はペプチド系化合物は、GHの欠損又は低下に起因する疾患を治療するための医薬組成物も提供する。該医薬組成物はGHの投与が有効である全ての疾患に用いることができ、GHの投与によって生じる様々な副作用を克服することができる。また、該医薬組成物は動物の成長促進剤などの動物用薬剤としても用いることができる。

【0021】

本願発明で開示されたCa上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを抗原として調製された抗体、当該抗体を用いた内在性GH分泌誘導ペプチドの測定方法、及び該抗体を具備した測定キットも本願発明に属する。

すなわち本願発明は、アシル化セリンという新規修飾アミノ酸を有する新規ペプチドホルモンの提供、及び当該ペプチドの構造を基本骨格とするCa上昇活性有する化合物の新規設計指針の提供である。また、本願発明によって開示された脂肪酸修飾ペプチド、GH放出ホルモン及びソマトスタチンによるGH分泌誘導機構の解明は、単にGH分泌誘導機構に限らず他のホルモン分泌制御機構にも敷衍することが示唆される。本願発明は、脂肪酸修飾ペプチドの循環器系および代謝系の制御因子としての多様な機能を開示するものであり、本願発明の効果は新しい生体制御機構の解明にも及ぶものである。

【0022】

具体的には本願発明は

- (1) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、
- (2) 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列において少なくともアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記(1)記

(3) 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22 および 23 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記 (2) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(4) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有し、①構成アミノ酸が修飾されているか又はされていない、かつ②少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換されているか又はされていないペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(5) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列、又は当該配列において少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記 (4) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(6) 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22 および 23 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記 (4) 乃至 (5) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(7) 修飾されたアミノ酸がアミノ末端から 3 番目のアミノ酸である前記 (1) 乃至 (6) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(8) 修飾されたアミノ酸におけるアミノ酸がセリン又はシステインであることを特徴とする前記 (7) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(9) アミノ酸の  $\alpha$  炭素に、(1) 炭素数 1 以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミド結合を介して炭素数が 1 若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は (2) H 又は炭素数 1 以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸を含有する前記 (1) 乃至 (6) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(6) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(11) 脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記(10)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(12) 炭素数が2乃至35である脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記(11)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(13) 炭素数が2、4、6、8、10、12、14、16および18の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記(12)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(14) 結合した脂肪酸がオクタン酸(octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(13)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(15) 結合した脂肪酸がデカン酸(decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(13)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(16) N末端が炭素数1以上の飽和あるいは不飽和アルキル又はアシル基により修飾され及び／又はC末端のカルボキシル基のOHがOZ又はNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>(Zは薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>はH及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す)であることを特徴とする前記(1)乃至(15)項記載のペプチド系化合物、

(17) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物、

(18) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物、

(19) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる当該疾患を治療するための医薬組成物、

(21) ヒト以外の動物に適用するための前記(17)乃至(19)記載の医薬組成物、

(21) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(22) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含む医薬組成物を投与することからなる当該疾患の治療方法、

(23) ヒト以外の動物に適用するための前記(21)乃至(22)記載の治療方法、

(24) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物に係るDNAであって、当該DNAの塩基配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする塩基配列を有する当該DNA、

(25) 配列番号6、7、14、15、20、21および24記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列を有する前記(24)記載のDNA、

(26) 配列番号6、7、14、15、20、21および24記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列のうち、アミノ酸をコードしている部分の配列を有する前記(24)記載のDNA、

(27) 前記(24)乃至(26)記載のDNAを有するベクター、

(28) 前記(27)記載のベクターを含有する細胞、

(29) 前記(24)乃至(26)記載のDNAを有するベクターを有し、且つ当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されたペプチド系化合物として産生することができる細胞、

(30) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物に対する抗体、

(31) 前記(30)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物を同定することを特徴とする当該ペプチド系化合物のアッセイ方法、

(32) 前記(30)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(16)記載のペプ

(33) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(24)乃至(26)記載のDNAを含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる当該方法、

(34) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(24)乃至(26)記載のDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする当該方法、

(35) 前記(11)乃至(15)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、配列番号8記載のアミノ酸配列中のセリン残基に脂肪酸が結合したペプチドとして産生することができる細胞を用いることを特徴とする製造方法、

(36) 前記(4)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取することを特徴とする、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチド系化合物の製造方法、

(37) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより、成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、

(38) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有す

る成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

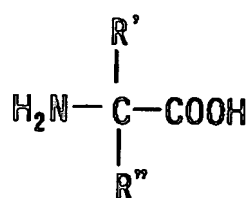
(39) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、及び

(40) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、に関する。

# 【0023】

なお、本発明において、アミノ酸とはL-アミノ酸、D-アミノ酸、 $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸、 $\gamma$ -アミノ酸、天然アミノ酸、合成アミノ酸等あらゆるアミノ酸を含む。又、修飾アミノ酸とは上記アミノ酸の任意の基、特に $\alpha$ -アミノ酸における $\alpha$ 炭素が化学修飾されているアミノ酸を意味する。すなわち、修飾アミノ酸は、 $\alpha$ -アミノ酸を式

【化1】



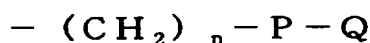
で表したとき、 $\text{R}'$ 、 $\text{R}''$ はH又は任意の置換基でよくて、要するに天然アミノ酸を化学修飾したものならどのようなものでもよい。なお、 $\text{R}'$ 、 $\text{R}''$ とのいずれか一方はHでもよい。 $\text{R}'$ 、 $\text{R}''$ で示される置換基としては、天然のアミノ酸に存在する置

置き換えたアミノ酸を修飾アミノ酸と称し、そのような置換分として、例えば天然に存在するアミノ酸が側鎖に—OH、—SH、—NH—又は—NH<sub>2</sub>を含む場合、これらをアシル化して形成される基が好適な例として挙げられる。

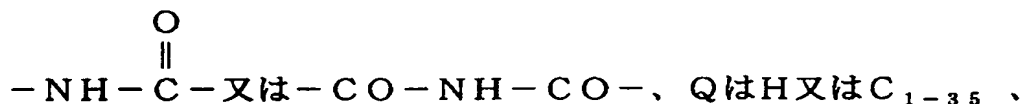
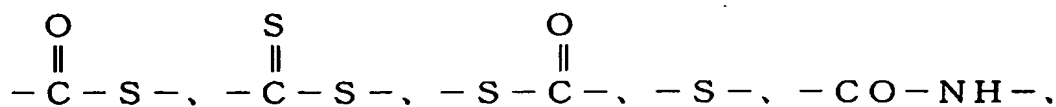
# 【0024】

そのためのアシル基としては段落番号〔0042〕に例示されている。又、さらに修飾アミノ酸は上記のR'又は／及びR"で示される基を例えば式

## 【化2】



(式中、nは0～10の整数、Pは $\begin{array}{c} O \\ || \\ -C-O- \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} O \\ || \\ -O-C- \end{array}$ 、 $-O-$ 、



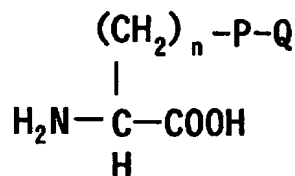
好ましくは C<sub>1-20</sub>のアルキル)

で置き換えたアミノ酸であってもよい。さらにPは—CO—でもよい。

# 【0025】

α-アミノ酸を上記式で表わした場合に、R'又はR"を上記の—(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>—P—Qで置き換えた修飾アミノ酸は好ましい実施の態様である。特にアミノ酸がセリンのα炭素に上記の式の—(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>—P—Qで示される置換基が存在する式

## 【化3】



で示される修飾セリンを構成単位とするペプチドが好ましい。

炭素数1以上のアルキル基を介して又は介さずエステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から結合様式についてさらに説明する。

## 【0027】

本件発明のペプチドを構成しているアミノ酸(又はアミノ酸残基とも表現する)は修飾アミノ酸(または修飾アミノ酸残基と表現する)であってよい。アミノ酸の化学構造が部分的に化学修飾されたものであってもよい。例えば、アミノ酸がセリン(又はトレオニン、チロシン、オキシプロリン)である場合は、そのアミノ酸は側鎖に水酸基を有する。アミノ酸がシステインである場合は、そのアミノ酸は側鎖にメルカプト基を有する。アミノ酸がリジン、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン、プロリン又はオキシプロリンである場合は、側鎖にアミノ基又はイミノ基を有する。

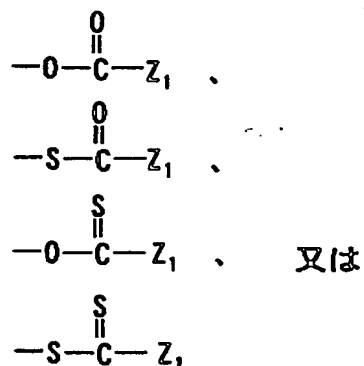
## 【0028】

これらの水酸基、メルカプト基、アミノ基、イミノ基は化学修飾されていてもよい。すなわち水酸基又はメルカプト基はエーテル化、エステル化、チオエーテル化又はチオエステル化されていてもよい。イミノ基はイミノエーテル化、イミノチオエーテル化、アルキル化されていてもよい。アミノ基はアミド化、チオアミド化又はカルバミド化されていてもよい。

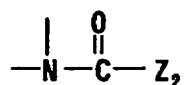
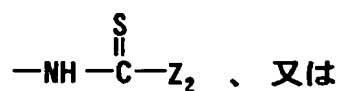
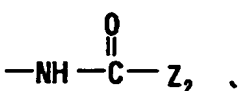
## 【0029】

そのように化学修飾された水酸基又はメルカプト基は例えば式

【化4】

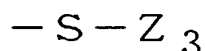
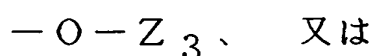






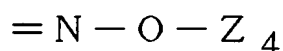
で表わすことができ、エーテル化された水酸基又はメルカプト基は式、

【化6】



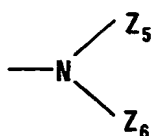
で表わすことができ、イミノエーテル化されたイミノ基としては式

【化7】



で表わすことができ、アルキル化されたアミノ基として式

【化8】



で示すことができる。上記式中、 $\text{Z}_1$ 、 $\text{Z}_2$ 、 $\text{Z}_3$ 、 $\text{Z}_4$ 、 $\text{Z}_5$ 及び $\text{Z}_6$ は本発明の精神に反しない限り、どのような化学修飾のための置換基であってもよいが、医薬品分野で常用されるあるいはペプチドのための化学修飾のための置換基が特許文献上又は学術文献上もよく知られているので、本発明においてもそのような自体公知の修飾のための置換基を採用することができ、かつ化学修飾はそのような従来公知の方法に従って行われてよい。

【0030】

上記式において、 $\text{Z}_1$ は水素原子又は直鎖状、分枝状もしくは環状のアルキル基

である。かかるアルキル基は飽和されているものであってもよい。炭素数は通常は $C_{1-50}$ 、好ましくは $C_{6-20}$ である。 $Z_2$ 、 $Z_3$ 、 $Z_4$ 、 $Z_5$ 又は $Z_6$ は水素原子又は直鎖状、分枝状もしくは環状のアルキル基であってよく、かかるアルキル基は飽和又は不飽和であってよい。炭素数は通常 $C_{1-10}$ 、好ましくは $C_{1-6}$ である。かかる $Z_1$ 、 $Z_2$ 、 $Z_3$ 、 $Z_4$ 、 $Z_5$ 又は $Z_6$ で表わされるアルキル基は例えば、水酸基、アミノ基、ハロゲン、ニトロ、 $C_{1-3}$ のアルコキシ基等通常ペプチドの化学修飾に使われる置換基で置換されていてもよい。上記において、

【化9】



の残基である場合は、脂肪酸が結合したアミノ酸の一例である。その場合の脂肪酸としては、例えばカプリル酸、カプリン酸、ララリン酸、酪酸、カプロン酸、ウンデシル酸、パルミチン酸、デカン酸、ノナデカンサン、ベヘンサン、モンタン酸、ラクセン酸などの飽和脂肪酸、例えばアクリル酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アアテアロール酸などの不飽和脂肪酸が挙げられる。不飽和脂肪酸はモノエンであってよいし、ポリエンであってよい。

【0031】

又さらに、修飾アミノ酸は $\alpha$ -アミノ酸の炭素に $\alpha$ 炭素に結合する、ペプチド結合を構成するカルボキシル基とアミノ基以外の基を水素原子又は飽和又は不飽和アルキル基で置換することにより形成される $\alpha$ -アミノ酸であってよい。

【0032】

【発明の実施の態様】

GHSレセプター（GHS-R）の内在性リガンドとなるペプチドについては、GHS-Rを発現している細胞に各種臓器又は組織の抽出物を添加し、細胞内カルシウムイオン濃度を測定することにより、当該内在性リガンドの臓器・組織間での分布を知ることができる。GHS-Rを発現している細胞としては、恒常的にGHS-Rを発現し

ていることが知られている視床下部及び脳下垂体、及びそれらの組織由来の細胞株があるが、GHS-R遺伝子を適当な細胞、例えばCHO細胞に導入・発現させた形質転換細胞が望ましい。細胞内カルシウムイオン濃度の測定法は公知の方法が利用できるが、望ましくは、カルシウムイオン濃度変化によるFluo-4 AM (Molecular Probe社) の蛍光強度の変化を利用したFLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices社)がよい。本願発明の内在性GHSペプチドにおいては、該ペプチドが発現している視床下部及び脳下垂体ではなく、消化器系の臓器である胃の抽出物に強いCa上昇活性が認められた。従って、目的のオーファン・レセプターの内在性リガンドを見いだすためには、該レセプターが発現している組織・臓器ばかりではなく、他の組織・臓器も広く探索することが必要である。

### 【0033】

Ca上昇活性が確認された組織・臓器の抽出物から、目的の内在性GHSペプチドを生成するためには、公知の精製方法を用いることができる。ペプチドの精製法としては、各種分画法による分画後、ゲル濾過、イオン交換及び逆相クロマトグラフィーを、単独又は組み合わせて用いるが有効であるが、必ずしも該クロマトグラフィーによる精製にこだわる必要はなく、ペプチドの精製に有効である手段は何でも利用可能である。また、組織・臓器よりペプチドを単離・精製する際には、組織・臓器に存在するプロテアーゼの作用による目的ペプチドの分解を防止するために、組織・臓器を沸騰水中で熱処理することによりプロテアーゼを失活させることが望ましい。熱処理し組織・臓器を氷冷除去することも、目的ペプチドの抽出・精製に効果がある。

### 【0034】

精製されたCa上昇活性を有するペプチドが、*in vitro* 及び*in vivo*でGH分泌誘導活性を確認するためには、公知の方法を利用することができる。例えば*in vitro*では、GHを分泌してGHS-Rの発現も確認されている脳下垂体細胞に添加して、細胞培養液中に分泌されるGHを、抗GH抗体を用いたラジオイムノアッセイによって測定することができる。また上記ラジオイムノアッセイ法において、抗GH抗体の代わりに他のホルモンに対する抗体を用いれば、該ホルモンの分泌量も測定できる。*In vivo*でのGH分泌誘導活性を確認するためには、Ca上昇活性を有するペ

【0035】

精製されたペプチドの構造解析には、公知の方法が使用可能である。ペプチドのアミノ酸配列を決定するためには、エドマン分解法によりカルボキシル末端より逐次アミノ酸残基を遊離して、該遊離アミノ酸を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によってアミノ酸を同定する方法、及び該方法を自動化したアミノ酸シーケンサーによる方法がある。また、GC-MASSによってイオン化したフラグメントの分子量を測定することにより、アミノ酸配列を決定する方法もある。本願発明の1つである修飾アミノ酸を含有するペプチドの場合は、上記アミノ酸配列を決定する際に修飾アミノ酸が「未知アミノ酸」と同定される。この場合、当該修飾ペプチドをアミノ酸単位に分解後、修飾アミノ酸を分離・精製して、常用される化合物構造決定法によって修飾アミノ酸を構造決定し、ペプチド全体の構造を知ることができる。また、修飾ペプチドをコードするcDNAから得られる該ペプチドのアミノ酸配列を有するペプチドを化学合成し、当該合成非修飾ペプチドと修飾ペプチドの分子量や物性等から修飾基の構造を推定する方法もある。

【0036】

構造決定されたペプチド中での、Ca上昇活性に必要な部分のアミノ酸配列（コア配列）は、該ペプチドをプロテアーゼで切断して生成するペプチド断片のCa上昇活性を測定することによって明らかにされる。用いられるプロテアーゼは、切断するペプチドのアミノ酸配列に特異性の高いプロテアーゼを用いてよいが、特異性が低くても部分分解の条件で反応させることにより該ペプチドから様々なペプチド断片が調製できる。このようにして調製されたペプチド断片のCa上昇活性を測定することにより、Ca上昇活性に必須のコア配列を知ることができる。内在性GH分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列の一部をもったペプチド断片および当該ペプチド断片のセリンの側鎖に脂肪酸がエステル結合した脂肪酸修飾ペプチドは化学的に合成することもできる。該合成ペプチド断片のより詳細に解析できる。同時に、種々の脂肪酸で修飾したペプチド断片のを比較することにより、Ca上昇活性に必要な脂肪酸の種類を決めることができる。また、脊椎動物におけるGH分泌誘導活性を有するペプチドのアミノ酸配列を比較することにより、脊椎動物で広

く保存されている領域を見いだすことができる。この領域は、アミノ酸配列から推定される塩基配列と一致する塩基配列を持つDNAを化学合成し、該DNAをプローブとして該ペプチドが発現している細胞のmRNAから作製したcDNAライブラリーをスクリーニングして、当該ペプチドをコードするcDNAを取得することができる。しかし、アミノ酸に対応するコドンは縮重しており、ペプチドのアミノ酸配列から推定される塩基配列が多くなり、このような多種類の塩基配列からなる合成DNAをプローブとしたスクリーニングが困難になることがある。そのような場合で、当該ペプチドのアミノ酸配列と一致する配列が、配列データベースにおいて公開された発現DNA断片（EST: Expressed Sequence Tag）の塩基配列から想定されるアミノ酸配列にある場合は、該ESTの塩基配列の一部からなるDNAを合成して、上記cDNAライブラリーのスクリーニングに用いることもできる。また、cDNAからゲノムDNAを取得することは、常用される方法で行うことができる。

### 【0037】

内在性GH分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列から推定される塩基配列を持つDNAを化学合成し、該DNAをプローブとして該ペプチドが発現している細胞のmRNAから作製したcDNAライブラリーをスクリーニングして、当該ペプチドをコードするcDNAを取得することができる。しかし、アミノ酸に対応するコドンは縮重しており、ペプチドのアミノ酸配列から推定される塩基配列が多くなり、このような多種類の塩基配列からなる合成DNAをプローブとしたスクリーニングが困難になることがある。そのような場合で、当該ペプチドのアミノ酸配列と一致する配列が、配列データベースにおいて公開された発現DNA断片（EST: Expressed Sequence Tag）の塩基配列から想定されるアミノ酸配列にある場合は、該ESTの塩基配列の一部からなるDNAを合成して、上記cDNAライブラリーのスクリーニングに用いることもできる。また、cDNAからゲノムDNAを取得することは、常用される方法で行うことができる。

### 【0038】

このようにして取得されたcDNAの塩基配列から、内在性GH分泌誘導ペプチドの前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列が明らかにされる。当該アミノ酸配列を解析することにより、シグナルペプチド、内在性GH分泌誘導ペプチド及びその他のペプチド部分、及びこれらのペプチドの切断点が明らかになり、内在性GH分泌誘導ペプチドの生成機構が明らかになる。なお、本願発明の1つである内在性GH分泌誘導ペプチドの一部のアミノ酸配列、当該ペプチドの前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列及び該ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列が、国際出願公開W0 98/42840において開示されているが、該出願で開示されたペプチドはモチリン（motilin）様活性を有する14アミノ酸からなるペプチドであり、本願発明で開示されたCa濃度上昇活性やGH分泌誘導活性については記載がない。

### 【0039】

本願発明に係るペプチド系化合物とは、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、次式（1）で示される構造において、少なくとも1つアミノ

酸で置換されているペプチド又は少なくとも一つのアミノ酸が非アミノ酸で置換されたペプチド類縁体、及びそれらのアミノ末端及び／又はカルボキシル末端が修飾されたペプチド誘導体をいう。本発明において、上記のペプチド、ペプチド類縁体及びペプチド誘導体をペプチド系化合物と総称する。また、当該ペプチド系化合物において、複数のアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸で置換されてもよい。本発明においては、通常1～10、好ましくは1～6のアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸で置換されていてもよい。又同様に1～10好ましくは1～6にアミノ酸が欠失又は付加されていてもよい。

#### 【0040】

本発明のペプチド系化合物は好ましくは細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び生体内で成長ホルモンの分泌を誘導するペプチドであって、少なくとも一つのアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換された化合物である。すなわち、本発明におけるペプチド系化合物は、細胞内カルシウムイオン濃度上昇活性又は／及び生体内成長ホルモン分泌誘導作用を有し、ペプチド鎖においてアミノ酸が修飾アミノ酸又は／及び非アミノ酸化合物で置換されたペプチド系化合物である。

#### 【0041】

そのような化合物の具体例として配列番号1、2又は3が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物、配列番号4又は5が示すペプチドにおいて第25番目アミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

#### 【0042】

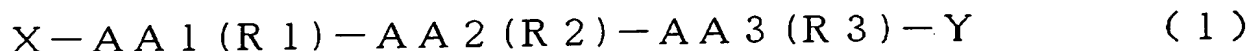
本発明におけるアシル化によって水酸基に導入されるアシル基は例えば有機カルボン酸、有機スルホン酸、有機リン酸化合物から水酸基を除去して形成される基である。有機カルボン酸としてはより具体的には、脂肪酸が挙げられ、その炭素数は好ましくは2～35（より好ましくは6～18、最も好ましくは8～16）である。そのような脂肪酸としては、具体的には、オクタン酸（カプリル酸）、デカン酸（カプリン酸）、ドデカン酸（ラウリル酸）、それらのモノエン又は

【0043】

第3番目のSerの水酸基がアシル化されている配列番号1のアミノ酸配列を含む、いかなるペプチド系化合物又はその薬理学的に許容される塩も本発明における好ましい実施の態様である。

【0044】

さらに又、本発明の好ましい実施の態様は下記一般式(1)で表される化合物又はその薬理学的に許容される塩である。



(式中、Xは、アミノ末端のアミノ酸の $\alpha$ -アミノ基の水素原子に相当する部分で、H又は炭素数が1又は複数の飽和又は不飽和アルキル又はアシル基が例示される。AA1はアミノ酸又はジペプチドを、AA2はアミノ酸、又は $-CH_2-CH(R4)-CO-$ もしくは $-CH_2-CH(R5)-CH_2-$ を示し、AA3はアミノ酸又はペプチド鎖を示す。R1、R2およびR3はアミノ酸の側鎖に相当する部分であって、アミノ酸の $\alpha$ 位炭素に結合したH又は置換基である。R1、R2又はR3の具体例としては、

(1) 炭素数1以上のアルキル鎖を介し又は介せず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から選択される結合様式で結合する炭素数1以上の飽和もしくは不飽和アルキル鎖、

(2) H又は炭素数1以上の飽和もしくは不飽和アルキル鎖又は通常のアミノ酸の側鎖を示す。

この場合、アミノ酸の $\alpha$ 位炭素に結合した $-CO-$ と $-NH-$ 以外の二つの結合手は同一又は異なる上記置換基に結合していてもよいし、その二つの結合手のうち一つが上記置換基に結合していて他の一つがHに結合していてもよい。

なお、AA1がジペプチドであるときその二つの置換基R1は同一であってもよいし異なってもよく、Yはカルボキシル末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基の水酸基に相当する部分で、OH、OZ又はNR6R7であって、Zは薬理学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基、R4又はR5はH又は低級の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基で、R6とR7とは同一又は異なってもよい。]

Xで示される炭素数が1以上の飽和又は不飽和アルキルとしては具体的にはメチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、t-ブチル、n-ヘプチル、n-ヘキシル、n-デシル、ビニル、プロパニル、ヘキセニル等のC<sub>1-20</sub>のアルキルが好ましい。

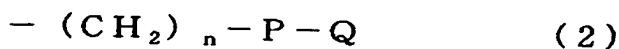
Xで示されるアシルとしては、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ベンゾイル等のC<sub>1-10</sub>カルボン酸アシル、ベンゼンスルホニル、ナフタレンスルホニル等のC<sub>7-13</sub>のスルホン酸アシルが挙げられる。

R4又はR5で示される基は、R1、R2又はR3で示される基と同意義であってよい。

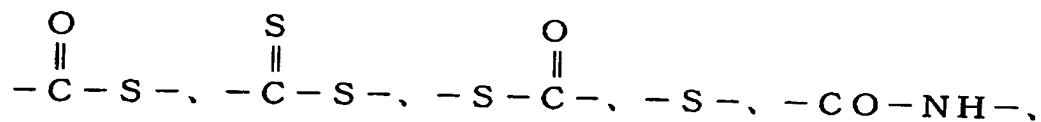
#### 【0046】

R1、R2又はR3で示される基(1)は例えば式(2)

【化10】



(式中、nは0~10の整数、Pは $-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O-$ 、 $-O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-$ 、 $-O-$ 、



$-NH-CO-$ 又は $-CO-NH-CO-$ 、QはH又は上記したXで

示されるC<sub>1-20</sub>のアルキルであってもよい。)

で示される基が好ましい。さらにPは $-CO-$ でもよい。

#### 【0047】

R1、R2又はR3で示される基(2)のアルキル鎖はXで示されるアルキル基と同意義であってよい。R1、R2又はR3で示される基(3)の通常のアミノ酸の側鎖は、天然のアミノ酸の側鎖であってよい。

Z、R6又はR7で示される低級のアルキル基としては例えばメチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、t-ブチル、i-ブチル、n-ペンチル、n-ヘキシル等のC<sub>1-6</sub>のアルキルが好ましい。



次に、本願発明に係るペプチド化合物の好ましい態様を以下に示す。

(1) AA1の好ましい態様；(ア) アミノ酸又はペプチド。例えば、Ser、Gly-Ser又は $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{CH(CH}_2\text{OH)CO-}$  (2アミノ酸残基間のペプチド結合部分が $\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$ である場合)等が挙げられる。(イ) 一級アミン。例えば、 $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{CH(CH}_2\text{OH)CH}_2\text{-}$  (2アミノ酸残基間のペプチド結合部分が $\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$ である場合)、 $\text{-NH-CH(CH}_2\text{OH)CH}_2\text{-}$  (2アミノ酸残基間のペプチド結合部分が $\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$ である場合)、 $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{CH(R1)CH}_2\text{-}$  (2アミノ酸残基に相当)等が挙げられる。

#### 【0049】

(2) AA2の好ましい態様；(ア) アミノ酸。例えば、Ser、homoSer、Cys、homoCys、Asp、Glu、Lys、Ala、Val、Leu、homoLeu、Ile、homoleu、オルニチン、アミノアジピン酸、メチオニン、エチオニン、ブチオニン、S-メチルシステイン等が挙げられるが、特にSerが好ましい。(イ) アミノ酸残基以外の構造； $\text{-CH}_2\text{-CH(R1)-CO-}$ 、 $\text{-CH}_2\text{-CH(R1)-CH}_2\text{-}$ 等が挙げられる (R1、R2は前記と同意義でよい)。

#### 【0050】

(3) AA3の好ましい態様；アミノ酸又はペプチド。例えば、Phe又は配列番号2又は3記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から4番目のPheから28番目のArgまでのアミノ酸配列を有するペプチド若くは当該配列のカルボキシル末端側のアミノ酸が、アミノ末端から5番目のLeuまで1つつつ欠失したペプチド。例えば

Phe Leu

Phe Leu Ser

Phe Leu Ser Pro

Phe Leu Ser Pro Glu

Phe Leu Ser Pro Glu His

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala

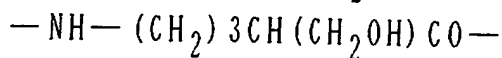
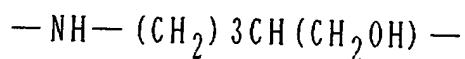
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln

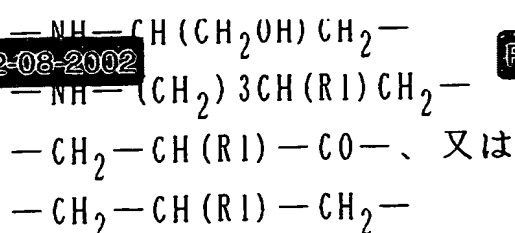
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
 Pro  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
 Pro Ala  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
 Pro Ala Lys  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
 Pro Ala Lys Leu  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
 Pro Ala Lys Leu Gln  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
 Pro Ala Lys Leu Gln Pro  
 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
 Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

がAA3の例として挙げられる。

# 【0051】

又さらに、AA3の例示において、アミノ酸はL-アミノ酸でもD-アミノ酸でもよいことはいうまでもない。又、AA3の上記例示において、例えば1～数個のアミノ酸（好ましくはアミノ酸配列の約3分の1程度まで）は非アミノ酸単位、例えば





で置き換えられてもよい(上記式中R1は前記と同意義)。上記式で示される基がAA3に複数個あり、しかもR1で示される基が複数個ある時、それらは同一又は異なる。又、さらに、AA3の例示における各アミノ酸のいずれも上記R3で示される置換基を有してよい。AA3で示される基において、R3が複数個存在する時は、それらは同一であっても異なってもよい。

### 【0052】

(4) R1、R2又はR3の好ましい態様；アミノ酸残基の側鎖に相当する部分であって、アミノ酸残基の $\alpha$ 炭素に、(1)炭素数1以上のアルキル鎖を介し又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から選択される結合様式で結合する炭素数が1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(2)H又は直接結合する炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を示し、XはH又は炭素数が1以上の飽和あるいは不飽和アルキル若しくはアシル基であってよい。

なお、アルキル酸、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド、カルバミド、飽和・不飽和アルキル、アシルは前記と同様であってよい。

### 【0053】

以下にペプチドを構成するアミノ酸が側鎖に水酸基、メルカプト基、イミノ基又はアミノ基を有する場合の当該側鎖の好ましい例を示す。なお、以下のRは炭素数1以上の飽和又は不飽和アルキル鎖を示す。かかるアルキル鎖はXで示される上記のアルキル鎖と同意義でよい。

- ア) Serの側鎖； $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}$ 又は $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$ 、
- イ) homoSerの側鎖； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}$ 又は $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$ 、
- ウ) Cysの側鎖； $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-\text{R}$ 又は $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}$ 、
- エ) homoCysの側鎖； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-\text{R}$ 又は $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}$ 、
- オ) Aspの側鎖； $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-\text{R}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$ 、

キ) LYSの側鎖;  $-(CH_2)_4-NH-CO-R$ 、

ク) アミノアジピン酸の側鎖;  $-CH_2-CH_2-CH_2-CO-O-R$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CO-NH-R$ 、

ケ) オルニチンの側鎖;  $-(CH_2)_3-NH-CO-R$

コ) 側鎖がアルキル鎖のアミノ酸であるAla、Val、Leu、ホモロイシン、Ile、ホモイソロイシン、S-メチルシステイン、メチオニン、エチオニン、ブチオニン等についても同様にアルキル基が上記のように式(2)で示される修飾されたアルキル基であってよい。

#### 【0054】

又、さらに本発明は、配列番号2又は3のアミノ酸配列において、アミノ末端から13、14又は15番目までのアミノ酸からなる部分ペプチドを含有する細胞内カルシウムイオン濃度上昇剤もしくはGH分泌誘導剤も、好ましい実施の態様として含むものである。この場合の部分ペプチドを構成する各アミノ酸単位は必ずしも化学修飾されている必要はない。

上記製剤は、上記部分ペプチドを例えば下記する公知の賦形剤及び添加剤と混合する等自体公知の製造方法によって容易に製造することができる。

#### 【0055】

本発明に係るペプチド系化合物は常法により得ることができる。例えば、既に上述のように天然の原料から単離されるか、又は組換えDNA技術及び／若くは化学的合成によって製造することができる。更にアミノ酸残基に修飾(例えば、アシル化)が必要な場合は自体公知の手段に従って修飾反応を施す。

#### 【0056】

本願発明に係るペプチドをコードするDNAを有する発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、当該培養物から目的のペプチドを採取することにより得られる。当該宿主細胞を選択することにより、当該細胞内において目的のペプチドにアシル化等の修飾がされた化合物を得ることができる。また、当該ペプチドが修飾されていない場合は、必要に応じて公知の手段に従ってアシル化等の修飾反応を行う。アシル化反応にはリパーゼ等の酵素を用いることもできる。

#### 【0057】

8、pUC19等)、枯草菌のベクター(pUB110、pTP5、pC194等)、酵母のベクター(YEp型、YRp型、YIp型)、又は動物細胞のベクター(レトロウィルス、ワクシニアウィルス等)等が挙げられるが、その他のものであっても、宿主細胞内で安定に目的遺伝子を保持できるものであれば、いづれをも用いることができる。当該ベクターは、適当な宿主細胞に導入される。目的の遺伝子をプラスミドに組み込む方法や宿主細胞への導入方法としては、例えば、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989)に記載された方法が利用できる。

#### 【0058】

上記プラスミドにおいて目的のペプチド遺伝子を発現させるために、当該遺伝子の上流にはプロモーターを機能するように接続させる。本願発明において用いられるプロモーターとしては、目的遺伝子の発現に用いる宿主細胞に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する宿主細胞がEscherichia属の場合はlacプロモーター、trpプロモーター、lppプロモーター、λPLプロモーター、recAプロモーター等を用いることができ、Bacillus属の場合はSP01プロモーター、SP02プロモーター等を用いることができ、酵母の場合はGAPプロモーター、PH05プロモーター、ADHプロモーター等を用いることができ、動物細胞の場合は、SV40由来プロモーター、レトロウィルス由来プロモーター等を挙げることができる。

#### 【0059】

上記のようにして得られた目的遺伝子を含有するベクターを用いて宿主細胞を形質転換する。宿主細胞としては細菌(例えば、Escherichia属、Bacillus属等)、酵母(Saccharomyces属、Pichia属、Candida属等)、動物細胞(CH0細胞、COS細胞等)等を用いることができる。培養時の培地としては液体培地が適当であり、当該培地中には培養する形質転換細胞の生育に必要な炭素源、窒素源等が含まれる。必要に応じてビタミン類、成長促進因子、血清などを添加する。

#### 【0060】

脂肪酸修飾ペプチドを直接製造するためには、該ペプチドの前駆体ポリペプチドを適切な位置で切断できるプロセッシング・プロテアーゼ活性を有し、当該ペ

細胞は、当該前駆体ポリペプチドをコードするcDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞がCa上昇活性又はGH分泌誘導活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを産生することを確認することにより、選抜できる。

### 【0061】

培養後、培養物から本発明に係るペプチドを常法により分離精製する。例えば、培養菌体又は細胞から目的物質を抽出するには、培養後、菌体又は細胞を集め、これをタンパク質変性剤（塩酸グアニジンなど）を含む緩衝液に懸濁し、超音波などにより菌体又は細胞を破碎した後、遠心分離を行う。次に上清から目的物質を精製するには、目的物質の分子量、溶解度、荷電（等電点）、親和性等を考慮して、ゲル濾過、限外濾過、透析、SDS-PAGE、各種クロマトグラフィーなどの分離精製方法を適宜組み合わせて行うことができる。

### 【0062】

本発明に係るペプチド化合物は常法により化学合成することができる。例えば、保護基の付いたアミノ酸を液相方及び／又は固相法により縮合、ペプチド鎖を延長させ、酸で全保護基を除去し、得られた粗生成物を上記の精製方法で精製することにより得られる。アシル化酵素又はアシル基転移酵素で選択的に目的位置にあるアミノ酸の側鎖をアシル化することもできる。

### 【0063】

ペプチドの製造法は従来既に種々の方法が充分に確立されていて、本発明のペプチド系化合物の製造もそのような自体公知の方法に従って容易に製造できる。例えば古典的なペプチド合成法に従ってもよいし、固相法に従ってもよい。

以下に、組換えDNA技術と化学合成を併用した本発明に係るペプチド化合物の製法について例を挙げる

具体例：

N末端部ペプチドの活性エステル、例えば、（1）Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R)-Osu、（2）Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R)-Phe-Osu、又は（3）Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R)-Phe-Leu-Osuを化学合成し、各々、組換えDNA技術により生産したC末端部ペ

ペプチドである(4) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR、(5) LSPENY...  
QPR、又は(6) SPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRとを結合、即ち、(1)と(4)、  
(2)と(5)及び(3)と(6)を結合させて、28個のアミノ酸からなるペプ  
チド化合物を得る。より具体的には、XXXXZSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRを大腸菌で  
発現させ、Boc2(0)でアミノ基を保護し、Boc-XXXXZSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(  
Boc)PPAK(Boc)LQPRを得る。次にアミノ酸Zのカルボキシル末端に選択的な酵素  
で切り出し、NH<sub>2</sub>-SPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPRに変換する。  
この化合物とBoc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R)-Osuを中性から弱アルカリ水溶液中で混合  
し、得られるBocGlySer(Bu)Ser(R)FLSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)  
LQPRをトリフルオロ酢酸処理すれば目的物が得られる。上記アミノ酸の一文字標  
記は、1997年12月10日、株式会社ニュートンプレス発行の「細胞の分子生物学第  
3版」の記載に従った。

### 【0064】

本願発明のペプチド系化合物の塩としては薬学的に許容される塩が好ましく、  
例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性  
または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩の好適な例として  
は、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マ  
グネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；ならびにアルミニウム塩、アンモニウ  
ム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチル  
アミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノ  
ールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベン  
ジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例として  
は、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有  
機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマル  
酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタン  
スルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられ  
る。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オル  
ニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例え  
ばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。これらの塩の中でも

【0065】

本願発明のペプチド系化合物またはその薬理学的に許容しうる塩は毒性が低く、GH分泌誘導作用を有し、そのままもしくは自体公知の薬理学的に許容しうる担体、賦形剤、増量剤などと混合して哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル等）に対して用いることができる。投与量は成人に静脈注射する場合1日0.01～5mg/kgであり、好ましくは0.04～1.5mg/kgである。この量を1日1回～3回投与するのが望ましい。本願発明のペプチド系化合物は、薬学的に許容される担体と配合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの固形製剤；またはシロップ剤、注射剤などの液状製剤として経口または非経口的に投与することができる。

【0066】

薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。賦形剤の好適な例としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤の好適な例としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。結合剤の好適な例としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。崩壊剤の好適な例としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウムなどが挙げられる。溶剤の好適な例としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。溶解補助剤の好適な例としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コ



とが挙げられる。懸濁化剤の好適な例としては、例えばステアリルトリエタールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン、などの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。等張化剤の好適な例としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。緩衝剤の好適な例としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。無痛化剤の好適な例としては、例えばベンジルアルコールなどが挙げられる。防腐剤の好適な例としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。抗酸化剤の好適な例としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

#### 【0067】

上記医薬組成物は、GHの投与による効果と同等以上の効果をもたらし、GHの投与によって起こる様々な副作用も低減できる。当該医薬組成物の適用可能な疾患又はその効果は、GH欠損又は低下が関係するものとして、例えば、小人症、正常人での骨芽細胞及び骨再構成の活性化、GH欠乏症成人での筋肉量及び筋力の増強、GH欠乏症成人での運動能力の向上、小児の重度火傷治癒、排卵誘発におけるゴナドトロピンとの併用、プレドニゾン投与によるタンパク質代謝異常の予防、重度免疫不全症におけるT細胞「教育」の促進、老人性の体重減少、脂肪組織拡大及び皮膚萎縮を抑制する効果などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、GH欠損又は低下と直接関係しない疾患又は効果としては、例えば実施例7に記載したように、当該医薬組成物は拍動量の増加効果があるから、心不全等の心疾患の治療に効果がある。当該医薬組成物の効果はヒトには限らない。すなわち、動物の成長促進、食肉中の脂身の低減等、GH投与と同等以上の効果がある。

また上記医薬組成物は以下のような疾患の治療または身体状態の改善に効果がある。高齢者における成長ホルモン放出の刺激処置、糖質コルチコイドの異化副作用の予防、オステオポロシスの予防と治療、免疫系の刺激、損傷治癒の促進、骨折修復の促進、成長遅滞の治療、成長遅滞に起因する腎不全もしくは機能不全の治療、成長ホルモン欠損児童を含む生理学的不足状態および慢性疾患に関連した不足状態の治療、肥満および肥満に関連した成長遅滞の治療、ブラーダー・ヴィリ症候群およびターナー症候群に関連した成長遅滞の治療、火傷患者の回復の促進および入院の削減、子宮内発育遅滞、骨格形成異常、高コルチコイド症およびクッシング症候群の治療、拍動性成長ホルモン放出の誘導；ストレス患者における成長ホルモンの代用、骨軟骨形成異常、ヌーナン症候群、精神分裂病、うつ病、アルツハイマー病、遅延損傷治癒および心理社会的剥奪の治療、肺機能不全および呼吸器依存症の治療、大手術後のタンパク質異化反応の減衰、癌やエイズ（AIDS）のような慢性疾患によるタンパク損失および悪液質の減少、膵島細胞症を含む高インスリン血症の治療、排卵誘発のためのアジュバント療法、胸腺の発育を刺激するためおよび加齢に伴う胸腺機能の衰退を防ぐため、免疫抑制患者の治療、筋肉強度、運動性の向上、高齢者における皮膚の厚さ、代謝恒常性、腎恒常性の維持、骨芽細胞、骨再造形および軟骨成長の刺激。また動物においても以下のような効果が期待される。動物の成長の速度増加、動物の乳生産もしくは獣毛生産増加、ペット動物における免疫系の刺激、ペット動物における高齢疾患の治療、家畜の成長促進並びにヒツジにおける増毛。

#### 【0069】

本願発明によるCa上昇活性又はGH分泌誘導活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを抗原とする抗体は、公知の方法により取得できる。当該抗体は、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体のいずれでもよく、それらの取得についても公知の方法が利用できる。また、これらの抗体を用いた脂肪酸修飾ペプチドの測定方法および当該測定法を利用した測定キットの作成も公知の方法が利用できる。

#### 【0070】

#### 【実施例】

以下実施例に従って、発明の詳細を述べ、分子生物学的な実施例を説明する。  
限り、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に依った。

### 【0071】

#### 実施例 1. GHS-R発現細胞株の作製とCa上昇活性の測定

GH分泌誘導因子 (GHS) がGHSレセプター (GHS-R) に結合することによって生ずる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇 (Ca上昇活性) をアッセイするために、以下のようにしてラットGHS-Rを発現している細胞株を作製した。ラットGHS-Rの全長cDNAは、ラット脳由来のcDNAを鋳型にして、RT-PCR (逆転写酵素-ポリメラーゼチェーンリアクション) によって取得した。公知のラットGHS-Rの塩基配列 [K. McKee, et al. Molecular Endocrinology 11, 415-423 (1997).] から、以下の塩基配列からなるセンスおよびアンチセンスプライマーを合成した。

センスプライマー: 5' -ATGTGGAACGCGACCCCCAGCGA-3'

アンチセンスプライマー: 5' -ACCCCCAATTGTTTCCAGACCCAT-3'

### 【0072】

増幅されたcDNAをベクターpcDNAIII (Invitrogen社) に繋ぎ、発現ベクターGHSR-pcDNAIIIを作製した。当該発現ベクターでCHO細胞を形質転換し、GHS-Rを安定に発現している形質転換細胞を1  $\mu$ g/mlのG418を含有する培地で選択した。選択された細胞株CHO-GHSR62は、 $10^{-10}$  ~  $10^{-9}$  MのGHRP-6 (Growth Hormone-Releasing hexapeptide) に応答した。細胞内カルシウムイオン濃度の変化 (Ca上昇活性) は、FLIPRシステム (Molecular Device社) で測定した。測定前に、 $4 \times 10^4$  のCHO-GHSR62細胞を壁面が黒い96穴マイクロプレート (Corning社) に植え、12 ~ 15時間培養した。細胞を4  $\mu$ Mの蛍光色素Fluo4 (Molecular Probe社) と1時間保持し、20 mM HEPESと2.5 mM プロベネシドを含むHank's BSSで4回洗浄し、試料を添加して蛍光の変化を測定することによって、Ca上昇活性をアッセイした。

### 【0073】

#### 実施例 2. 内在性GH分泌誘導ペプチドの精製

実施例 1 に記載した CHO-GHSR62細胞を用いて、ラット由来の各種組織・臓器について、Ca上昇活性を調査した結果、ラット胃由来のペプチド抽出物が0.5 mg相

を精製した。

### 【0074】

新鮮なラットの胃40 gを、混在するプロテアーゼを失活するために、5倍量の沸騰水中で5分間煮沸した。冷却後、煮沸した試料を1M AcOH-20 mM HClに調整し、ポリトロン・ミキサーを用いてペプチドを抽出した。抽出液を11,000 rpm、30分間遠心し、上清をエバポレーターで約40 mlに濃縮した。濃縮液にアセトンを66%になるように添加して、アセトン沈殿を行い、生じた沈殿を除去した後、上清のアセトンを蒸発させた。上清を、0.1% TFA（トリフルオロ酢酸）で平衡化した10 gのSep-Pak C18 カートリッジ（Waters 社製）に加え、10% CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFAで洗浄後、60% CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFAで溶出した。溶出液の溶媒を蒸発後、凍結乾燥を行った。試料を1M AcOHに溶解して、1M AcOHで平衡化したSP-Sephadex C-25（H<sup>+</sup>型）に吸着させた。1M AcOH、2Mピリジンおよび2M ピリジン-AcOH（pH 5.0）で段階的に溶出することによって、SP-I、SP-IIおよびSP-IIIの3つの画分を、それぞれ得た。SP-III画分をSephadex G-50ゲル濾過カラムに掛け、各々の画分の一部についてCHO-GHSR62細胞を用いたCa上昇活性のアッセイを行った。Sephadex G-50カラムクロマトグラフィーの結果を図1aに示したが、分子量約3,000に相当する活性画分（図1a中、フラクション43-48）を、TSK CM-2SWカラム（4.6 x 250 mm、Tosoh社製）を用いpH 6.4で、CM-イオン交換によるHPLC（高速液体クロマトグラフィー）で分画した。CM-HPLCでの活性画分を、同一カラムを用い、pH 4.8で二次CM-HPLCで分画した（図1b）。活性画分（図1b中、溶出時間55-56分）を、 $\mu$ Bondasphere C-18カラム（3.9 x 150 mm、Waters社製）を用いた逆相HPLCで単一にまで精製した。40 gのラットから16  $\mu$ gのCa上昇活性を有するペプチドを精製し、グレリン（ghrelin）と命名した。

### 【0075】

#### 実施例3. グレリンの構造解析

精製したラット由来のグレリンのアミノ酸配列をペプチド・シーケンサー（ABI 494、Applied Biosystems社）で決定した。グレリンは、Gly Ser Xaa Phe Le

His Gln Lys Ala Lys Glu Ser Lys Lys Phe Phe Ala  
a Lys Leu Gln Pro Arg (Xaaは未同定アミノ酸) の配列からなる28アミノ酸残基  
で構成されるペプチドであった。XaaはラットcDNAの塩基配列からSerであり、当  
該ペプチドにおいてはSerが何らかの修飾を受けていることが推定された。そこ  
で、アミノ末端から3番目のセリンが修飾されていない非修飾グレリンをペプチ  
ド合成機 (ABI 433A、Applied Biosystems社) で化学合成した。非修飾合成グレ  
リンの逆相HPLCでの溶出時間は、天然型グレリンと大きく異なっていた (図2a)  
ので、非修飾合成グレリンは天然型グレリンよりも著しく親水性であることがわ  
かった。以上の結果から、天然型グレリンのアミノ末端から3番目のセリン (セ  
リン3) は疎水性の残基で修飾されていることがわかった。

### 【0076】

セリン3の修飾基を明らかにするために、精製したグレリンを電子スプレーイ  
オン化マス分析機 (ESI-MS) 分析した。観測された天然型グレリンの分子量 ( $3314.9 \pm 0.7$ ) は、cDNAの塩基配列から得られた非修飾グレリンペプチドの分子量  
(3188.5) よりも約126大きかった。以上の結果から、天然型グレリンはセリン3  
の水酸基がn-オクタノイル (C8:0) 脂肪酸で修飾されていると推定された。この  
ことを確認するために、n-オクタノイル (C8:0) グレリンペプチドを化学合成し  
て、逆相HPLCでの溶出時間を調べた。n-オクタノイル (C8:0) ペプチドの化学合  
成は、セリン3の水酸基以外の全ての官能基を保護したペプチドをペプチド合成  
機 (ABI 433A、Applied Biosystems社) を用いてFmoc固相法で合成し、セリン3  
の水酸基を4-(ジメチルアミノ)ピリジンの存在下で、n-オクタン酸とエチル-3-(  
3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドでアシル化して合成した。合成したn  
-オクタノイルペプチドは精製した天然型グレリンと同一の溶出時間であった (図2a)。  
さらに、合成n-オクタノイルペプチドおよび天然型グレリンをキモトリ  
プシン処理によって得られる、アミノ末端から4番目までのペプチド断片 (Gly  
1-Phe 4) は、逆相HPLCで同一の溶出時間を示した。以上の結果から、ラット  
由来の天然型グレリンは配列番号2に記載のアミノ酸配列を有し、セリン3の水酸  
基がn-オクタン酸 (カプリル酸) でアシル化された構造 (図2c) であると結論さ  
れた。

また、ヒトグレリンをヒト胃抽出物から精製し、その構造が配列番号3に記載したアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のセリン側鎖の水酸基がn-オクタン酸（カプリル酸）でアシル化された構造であるがわかった（図4a）。なお上記ラット及びヒト由来のグレリンの構造は、図1b中の活性画分のうち最初のピーク画分（溶出時間55-56分）精製したものの構造であるが、図1bの他の活性画分についても精製後、上記と同様の方法で構造解析を行った結果、セリン3を修飾している脂肪酸はカプリル酸（C8:0）以外に、カプリル酸のモノエン酸（C8:1）、カプリン酸（C10:0）およびそのモノエン酸（C10:1）、およびラウリル酸（C12:0）およびそのモノエン酸（C12:1）があることがわかった。

## 【0078】

## 実施例4. グレリンのCa上昇活性

天然型グレリンおよびn-オクタノイル修飾合成グレリンはCa上昇活性を有していたが、非修飾合成グレリンはCa上昇活性を示さなかった（図2b）。また、n-オクタン酸またはn-オクタン酸と非修飾合成グレリンの混合物はCa上昇活性を示さなかったことから、天然型グレリンのn-オクタン酸基はCa上昇活性に重要な構造であることがわかった。以後、グレリンとは[0-n-オクタノイル-セリン3]-グレリン（図2c）のことを示す。

## 【0079】

グレリンは、CHO-GHSR62細胞において、GHRP-6よりも高い細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性（Ca上昇活性）を示したが、GHRH（GH放出ホルモン、図3aではGRF）はCa上昇活性を示さなかった（図3b）。グレリンのCa上昇活性は $10^{-11}$  Mから認められ、 $EC_{50}$ は2.5nMであった。GHS-Rの特異的アンタゴニストである[D-Lys 3]-GHRP-6 [R. G. Smith, et al., Science 260, 1640-1643 (1993)]  $10^{-4}$  Mの存在下で、グレリンによるCa上昇活性は抑制され、高濃度のグレリンで、アンタゴニスト非存在下でのCa上昇活性に回復する（図3b）。以上の結果は、グレリンのCa上昇活性がGHS-Rの特異的アンタゴニストによって拮抗的に阻害されることを示している。

## 【0080】

グレリンのアミノ酸配列は公知のいかなるペプチドのアミノ酸配列とも相同性を示さなかったが、GenBankデータベースをホモロジー検索したところ、ラットEST (Expressed Sequence Tag) 配列の1つ (GenBank 受理番号A1549172) に同一の配列が認められた。このEST配列を基に以下のPCRプライマーを合成した。

センスプライマー: 5' -TTGAGCCCAGAGCACCAGAAA-3'

アンチセンスプライマー: 5' -AGTTGCAGAGGAGGCAGAAGCT-3'

#### 【0081】

ラット胃由来のcDNAを鋳型に上記の2つプライマーを用いてRT-PCRを行った。PCRの条件は、1サイクルが98℃で10秒間、55℃で30秒間、72℃で1分間を、35サイクル行った。増幅されたDNA断片をプローブとして、ラット胃cDNAライブラリーをスクリーニングした。約 $2 \times 10^5$ の組換えファージをスクリーニングして、ラット由来グレリンをコードする全長cDNAを取得した。

#### 【0082】

ラットグレリンcDNAは、配列番号6に記載した501塩基からなり、117アミノ酸 (図4a) からなるグレリン前駆体 (prepro-ghrelin) をコードしていた。グレリン前駆体のアミノ末端の23アミノ酸残基はシグナルペプチドの性質を備えていた。グレリンはグリシン24から始まり、成熟型グレリンの最後の2つのアミノ酸 (Pro-Arg) は、プロテアーゼによる切断を受ける配列であった。

#### 【0083】

ラットグレリンcDNAを用いて、低ストリンジेंट条件でヒト胃cDNAライブラリーをスクリーニングして、全長ヒトグレリンcDNAを取得した。ヒト胃cDNAライブラリーは、ヒト胃poly(A)<sup>+</sup>RNA (Clontech社) から、cDNA合成キット (Pharmacia社) を用いて作製した。取得した全長ヒトグレリンcDNAは、配列番号7に記載した511塩基からなり、117アミノ酸 (図4a) からなるヒトグレリン前駆体 (prepro-ghrelin) をコードしていた。ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列は、82.9%の同一性を示し、グレリンは生物種間で高度に保存されていることが判明した。

#### 【0084】

グレリンの組織間分布を知るために、ラットの種々の組織から用いられたRNA (A) RNAを解析した(図4b)。ラット組織のノザンブロット解析によって、0.6 kbのグレリン前駆体mRNAが胃に認められた。心室(Ventricle)にも2本のかすかなバンドが認められたが、これらは6.2 kbおよび1.2 kbのmRNAで、胃でのmRNAよりも大きく、胃とは異なったmRNAのスプライシングが推定された。以上の結果からグレリンの主な発現部位は胃であることがわかった。

## 【0085】

## 実施例6. グレリンの下垂体ホルモン分泌への効果

グレリンがGH分泌誘導活性を有しているかをin vitroおよびin vivoで調べた。まずin vitroでのアッセイとして、下垂体前葉の初期培養細胞へのグレリンの効果を調べた。4週令の雄SDラットから下垂体前葉を採取し、コラゲナーゼ処理で分散させた後、細胞を集め、10%FCS(ウシ胎児血清)と抗生物質を含むDMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium)培地で2回洗浄し、DMEM培地に懸濁して、下垂体前葉初期培養細胞を調製した。 $5 \times 10^4$ の細胞を、ポリ-D-リジンでコートした96穴の細胞培養プレートに植え、3~4日培養した。培養液を0.1 mlの試料を含有するDMEM培地と交換し、37℃で15分間保持した。培養液の一部を採取して、ラジオイムノアッセイによって、培養液中の各種下垂体ホルモンの濃度を測定した。下垂体ホルモンのうち、GH、FSH、LH、PRL、TSHはBiotrak/Amersham社製のキットを用い、ACTHはPeninsula Laboratories社製の高感度EIAキットを用いた。

## 【0086】

グレリンを下垂体前葉初期培養細胞に添加すると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が認められ、非修飾合成グレリンでも弱いながらもCa上昇活性が認められた(図5a)。この結果は、グレリン及び非修飾合成グレリンが下垂体細胞に直接作用することを示している。次に、下垂体前葉初期培養細胞を用いてグレリンがGH分泌誘導活性を調べたところ、 $10^{-6}$  Mのグレリンの添加により、培養液中のGH濃度だけが濃度依存的に増加し、他の下垂体ホルモン(FSH、LH、PRL、TSH)の濃度増加は認められなかった(図5b)。

## 【0087】



下(250 g)の静脈に注射後、60分まで経時的に血液を採取して、血漿中の下垂体ホルモンの濃度を上記ラジオイムノアッセイによって測定した。下垂体ホルモンの内、GHだけが血液中に放出され、グレリンの静脈注射後5~10分で最高値に達した。この結果から、胃から血液中に放出されたグレリンが下垂体前葉細胞に作用し、血液中にGHを放出することがわかり、グレリンが未同定だった特異的な内在性GH分泌誘導物質であることが確認された。

### 【0088】

#### 実施例7. ラットでの心拍出量増加

麻酔下ラットを用いて心血管系に及ぼすグレリン急性投与の効果を調べた。体重220-250gのWistar系雄性ラット(ケアリー)を用い、心血管系に及ぼすグレリン急性投与の効果を検討するためラットを無作為に4群(10, 1, 0.5, 0.2  $\mu$ g 投与群)に分けた。グレリンは生理食塩水で希釈し、ラット1匹あたりの投与量を、10, 1, 0.5, 0.2  $\mu$ gに調整して、心拍出量測定のため右総頸静脈に挿入したインジェクションチューブ(PE50)から120  $\mu$ l 急性投与した。

### 【0089】

動力学的指標として全身血圧、心拍出量を測定し、さらに末梢血管抵抗値を算出した。ラットをベントバルビタールで麻酔後、背位に固定した。平均血圧測定のために、右大腿動脈にヘパリンで満たしたポリエチレンカニューレ(PE50)を挿入した。心拍出量の測定は熱希釈式心拍出量計(CARDIOTHER M500R)を用いて測定した。右総頸静脈に生理食塩水で満たしたインジェクションチューブ(PE50)を挿入し、右心室内で留置した。右総頸動脈からマイクロカテーテルを挿入し、大動脈起始部に留置した。注入液は室温(25℃)の生理食塩水100  $\mu$ lを用いた。熱希釈式心拍出量計のMEASUREスイッチを押すと同時に注入液(生理食塩水100  $\mu$ l)を注入し、心拍出量を測定した。測定は5回行いその平均値を心拍出量とした。平均血圧および心拍出量は、グレリン投与前、投与後1, 5, 15, 30分の値を測定した。末梢血管抵抗は平均血圧を心拍出量で除して算出した。

### 【0090】

	体重 (g)	グレリン1 $\mu$ g投与後の心拍出量 (ml/min/kg)				
		0分	1分	5分	15分	30分
平均	230	347	382	367	341	338
SEM	3.7	14.3	10.2	11.5	7.9	8.8

【表2】

	体重 (g)	グレリン10 $\mu$ g投与後の心拍出量 (ml/min/kg)				
		0分	1分	5分	15分	30分
平均	237	350	390	392	370	344
SEM	1.0	8.5	7.4	15.8	14.7	13.8

グレリン1 $\mu$ g投与群（表1）及びグレリン10 $\mu$ g投与群（表2）において、投与後1分及び5分で、心拍出量の増加が認められた

【0091】

実施例8. 各種起源からのグレリンおよびグレリン-27の単離

ラット胃抽出物から実施例2に記載した方法でCa上昇活性を指標にグレリンを精製した。二次CM-HPLCでの活性画分（図1b中、溶出時間59分）を、 $\mu$ Bondasphere C-18カラム（3.9 x 150 mm、Waters社製）を用いた逆相HPLCで単一にまで精製した。この画分を電子スプレーイオン化マス分析機（ESI-MS）分析した結果、分子量（3187.2 $\pm$ 0.9）のピークが観測されたが、この値は28アミノ酸からなりオクタン酸（C8）修飾された天然型グレリンよりも約126小さかった。このペプチドのアミノ酸配列をペプチド・シーケンサー（ABI 494、Applied Biosystems社）で決定したところ、Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg（Xaaは未同定アミノ酸）の配列からなる27アミノ酸残基で構成されるペプチドであった。すなわち、28アミノ酸で構成されるグレリンのアミノ末端から13番目又は14番目のグルタ

、実施例9に示すように28アミノ酸のグレリンと同様であることから、グレリン-27と命名した。ヒトの胃抽出物からも、ラットの場合と同様にヒト・グレリン-27を単離し、配列番号11記載のアミノ酸配列からなることを確認した。なお、上記二次CM-HPLCで64-65分にあるピーク画分を精製し、電子スプレーイオン化マス分析機(ESI-MS)分析した結果、分子量( $3341.4 \pm 0.9$ )のピークが観測された。この脂肪酸修飾ペプチドは28アミノ酸からなることから、グレリン(28アミノ酸)のアミノ末端から3番目のセリンがデカン酸(C10)で修飾されたものであることがわかった。

### 【0092】

グレリン27前駆体をコードするcDNAを、実施例5で作成したラット胃cDNAライブラリーから、実施例5で作成したPCR増幅DNA断片をプローブとした、ブラックハイブリダイゼーションでクローニングした。cDNAの塩基配列を決定し、グレリン27前駆体をコードすることを確認した。得られたグレリン-27前駆体cDNAは、配列番号14記載の塩基配列からなり、配列番号12記載のアミノ酸配列を有する116アミノ酸からなるグレリン-27前駆体をコードしていた。また、上記と全く同様の方法でヒト・グレリン-27前駆体cDNAをクローニングし、配列番号15記載の塩基配列からなり、配列番号13記載のアミノ酸配列を有する116アミノ酸からなるヒト・グレリン-27前駆体をコードしていることがわかった。

### 【0093】

ブタ由来のグレリンおよびグレリン-27の前駆体をコードするcDNAを、ブタcDNAライブラリーから実施例5に記載の方法によって、実施例5に記載のPCR増幅DNA断片をプローブとしたブラックハイブリダイゼーションでクローニングした。得られたcDNAクローンの塩基配列を決定し、ブタ・グレリン前駆体またはブタ・グレリン27前駆体をコードしていることを確認した。得られたブタ・グレリン前駆体cDNAは、配列番号20記載の塩基配列からなり、配列番号18記載のアミノ酸配列を有する118アミノ酸からなるグレリン前駆体をコードしていた。また、ブタ・グレリン-27前駆体cDNAは、配列番号21記載の塩基配列からなり、配列番号19記載のアミノ酸配列を有する117アミノ酸からなるグレリン-27前駆体を

っている。

#### 【0094】

ウシ・グレリン前駆体cDNAはPCR法によってクローニングした。すなわち、ラット、ヒトおよびブタ由来のグレリン及びグレリン-27で保存されているアミノ酸配列を基に設計した塩基配列を有する合成DNAをプライマーとして、ウシ胃cDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行った。増幅されたDNA断片は配列番号24記載の塩基配列を有しており、配列番号23記載のウシ・グレリン-27前駆体の一部をコードしていた。従ってウシ・グレリン-27は配列番号22記載のアミノ酸配列を有している。また、ウシ胃cDNAライブラリーを鋳型とする上記PCRで増幅されたDNA断片中には、グレリン（28アミノ酸）前駆体をコードするDNAはなかった。

ラット、ヒトおよびブタ由来のグレリン、及びラット、ヒト、ブタおよびウシ由来のグレリン-27のアミノ酸は、非常によく似ており、特にアミノ末端から10番目までのアミノ酸配列は、上記7種のグレリンで完全に一致していた。

#### 【0095】

##### 実施例9. 各種グレリン誘導体の活性比較

ラットおよびヒト由来のグレリンを各種プロテアーゼによる部分分解したペプチド断片、又は化学合成したペプチドのCa上昇活性を比較することにより、Ca上昇活性に必要なコア・アミノ酸配列および修飾脂肪酸の鎖長の最適値を求めた。Ca上昇活性は最大値の50%の活性を示すグレリンの濃度（EC50, nM）で表した。従って、EC50の値が低い程、活性が高いことになる。

## 各種グレリン誘導体の活性比較

起源	配列番号	アミノ酸	脂肪酸修飾	Ca 上昇活性 (EC50, nM)	備考
ヒト	3	1-28	Acyl (C:8)	2.6	天然型グレリン
ヒト	3	1-15	Acyl (C:8)	7.0	
ヒト	3	1-11	Acyl (C:8)	15	
ラット	2	1-28	Acyl (C:8)	2.9	天然型グレリン
ラット	2	1-15	Acyl (C:8)	8.6	
ラット	2	1-11	Acyl (C:8)	15	
ラット	2	1-10	Acyl (C:8)	19	
ラット	2	1-9	Acyl (C:8)	38	
ラット	2	1-8	Acyl (C:8)	100	
ラット	2	1-4	Acyl (C:8)	480	
ラット	2	16-28	Acyl (C:8)	>10000	
ラット	2	(1-12)+(14-28)	Acyl (C:8)	2.8	グレリン-27
ラット	2	1-28	Acyl (C:16)	3.1	
ラット	2	1-28	Acyl (C:10)	2.6	
ラット	2	1-28	Acyl (C:6)	16	
ラット	2	1-28	Acyl (C:4)	280	
ラット	2	1-28	Acyl (C:2)	780	

## 【0096】

グレリンのCa上昇活性は、アミノ末端側に存在する。アミノ末端から4番目のアミノ酸までのペプチドで十分なCa上昇活性はあるが、アミノ末端から10番目のアミノ酸までのペプチドであれば、天然型グレリンに近い、強いCa上昇活性がある。また修飾脂肪酸の鎖長について、C:2（アセチル基）であっても十分活性はあるが、C:8（オクタノイル基）でCa上昇活性が最高になり、その後脂肪酸の炭素数がC:10（デカノイル基）、C:16と増加しても強いCa上昇活性は変化しない

以上であれば、上昇活性が最も強くなる

【0097】

【発明の効果】

本発明の新ペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩は、人又は動物に投与することによってGHの分泌を誘導し、実質的な副作用を伴うことなく、小児の成長促進及び成人のGH欠乏により代謝機能の欠損を改善する医薬として、そしてその抗体はGH欠乏により疾病の診断にさらには学術分野の研究ツールとして優れた作用効果を奏する。

【0098】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kangawa, Kenji

<120> New Peptides

<130>

<150> JP 11-210002

<151> 1999-7-23

<160> 7

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro

1

5

<210> 2

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;223&gt; Amino acid sequence for rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;2

Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Lys	Ala	Gln	Gln	Arg	Lys
1				5					10					15	
Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Gln	Pro	Arg				
				20				25							

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;223&gt; Amino acid sequence for human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;3

Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Arg	Val	Gln	Gln	Arg	Lys
1				5					10					15	
Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Gln	Pro	Arg				
				20				25							

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;223&gt; Amino acid sequence for a prepro-form of rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;4

Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser Met Leu  
 1 5 10 15  
 Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His  
 20 25 30  
 Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu  
 35 40 45  
 Gln Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln  
 50 55 60  
 Ala Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe  
 65 70 75 80  
 Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg  
 85 90 95  
 Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu  
 100 105 110  
 Ala Pro Ala Asn Lys  
 115

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Amino acid sequence for prepro-form of human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>5

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu  
 1 5 10 15  
 Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His  
 20 25 30  
 Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu



Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln

50

55

60

Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe

65

70

75

80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln

85

90

95

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu

100

105

110

Ala Pro Ala Asp Lys

115

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 501

&lt;212&gt; cDNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (31).... (381)

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rat endogenous peptide  
s of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;6

tccagatcat ctgtcctcac caccaaggcc atg gtg tct tca gcg act

48

Met Val Ser Ser Ala Thr

1

5

atc tgc agt ttg cta ctc ctc agc atg ctc tgg atg gac atg gcc atg

96

Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu Trp Met Asp Met Ala Met

10

15

20

gca ggt tcc agc ttc ttg agc cca gag cac cag aaa gcc cag cag aga

144

aag gaa tcc aag aag cca cca gct aaa ctg cag cca cga gct ctg gaa 192  
 Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu Glu  
 40 45 50  
 ggc tgg ctc cac cca gag gac aga gga caa gca gaa gag gca gag gag 240  
 Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu  
 55 60 65 70  
 gag ctg gaa atc agg ttc aat gct ccc ttc gat gtt ggc atc aag ctg 288  
 Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu  
 75 80 85  
 tca gga gct cag tac cag cag cat ggc cgg gcc ctg gga aag ttt ctt 336  
 Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala Leu Gly Lys Phe Leu  
 90 95 100  
 cag gat atc ctc tgg gaa gag gtc aaa gag gcg cca gct aac aag 381  
 Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala Pro Ala Asn Lys  
 105 110 115  
 taaccactga caggactggt ccctgtactt tcctcctaag caagaactca catccagctt 441  
 ctgcctcctc tgcaactccc agcactctcc tgctgactta caaataaatg ttcaagctgt 501

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 511

&lt;212&gt; DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (34).... (385)

&lt;213&gt; Homo sapiens

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

gcaggccat ctgtctgcaa cccagctgag gcc atg ccc tcc cca

45

Met Pro Ser Pro

1

ggg acc gtc tgc agc ctc ctg ctc ctc ggc atg ctc tgg ctg gac ttg 93

Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu Trp Leu Asp Leu

5

10

15

20

gcc atg gca ggc tcc agc ttc ctg agc cct gaa cac cag aga gtc cag 141

Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln

25

30

35

cag aga aag gag tcg aag aag cca cca gcc aag ctg cag ccc cga gct 189

Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala

40

45

50

cta gca ggc tgg ctc cgc ccg gaa gat gga ggt caa gca gaa ggg gca 237

Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala Glu Gly Ala

55

60

65

gag gat gaa ctg gaa gtc cgg ttc aac gcc ccc ttt gat gtt gga atc 285

Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile

70

75

80

aag ctg tca ggg gtt cag tac cag cag cac agc cag gcc ctg ggg aag 333

Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala Leu Gly Lys

85

90

95

100

ttt ctt cag gac atc ctc tgg gaa gag gcc aaa gag gcc cca gcc gac 381

Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp

105

110

115

aag tgatcgccca caagccttac tcacctctct ctaagtttag aagcgctcat 434

Lys

ctggcttttc gcttgcttct gcagcaactc ccacgactgt tgtacaagct caggaggcga 494

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>8

Gly Ser Ser Phe

1

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>9

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln

1

5

10

<210> 10

<211> 27

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<223> Amino acid sequence for rat endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400>10

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;223&gt; Amino acid sequence for human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 11

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu

1

5

10

15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;223&gt; Amino acid sequence for a prepro-form of rat endogenous peptides ( 27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 12

Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu

1

5

10

15

Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His

20

25

30

Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln

Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala

50

55

60

Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp

65

70

75

80

Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala

85

90

95

~~Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala~~

100

105

110

Pro Ala Asn Lys

115

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

<223> Amino acid sequence for prepro-form of human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 13

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu

1

5

10

15

Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His

20

25

30

Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln

35

40

45

Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala

50

55

60

Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp

65

70

75

80

Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala  
100 105 110  
Pro Ala Asp Lys  
115

```

<210> 14
<211> 498
<212> cDNA
<213> Rattus norvegicus
<220>
<221> CDS
<222> (31)....(378)
<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rat endogenous peptide
s (27 amino acids) of growth hormone secretagogue
<400> 14

```

tccagatcat	ctgtcctcac	caccaaggcc	atg	gtg	tct	tca	gcg	act											48
			Met	Val	Ser	Ser	Ala	Thr											
			1										5						
atc	tgc	agt	ttg	cta	ctc	ctc	agc	atg	ctc	tgg	atg	gac	atg	gcc	atg				96
Ile	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	Leu	Trp	Met	Asp	Met	Ala	Met				
			10						15						20				
gca	ggc	tcc	agc	ttc	ttg	agc	cca	gag	cac	cag	aaa	gcc	cag	aga	aag				144
Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Lys	Ala	Gln	Arg	Lys				
			25						30						35				
gaa	tcc	aag	aag	cca	cca	gct	aaa	ctg	cag	cca	cga	gct	ctg	gaa	ggc				192
Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Gln	Pro	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly				
			40					45							50				

110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240  
 Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala Glu Glu Ala Glu Gln Glu  
 55 60 65 70  
 ctg gaa atc agg ttc aat gct ccc ttc gat gtt ggc atc aag ctg tca 288  
 Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser  
 75 80 85  
 gga gct cag tac cag cag cat ggc cgg gcc ctg gga aag ttt ctt cag 336  
 Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln  
 90 95 100  
 gat atc ctc tgg gaa gag gtc aaa gag gcg cca gct aac aag 378  
 Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala Pro Ala Asn Lys  
 105 110 115  
 taaccactga caggactggt ccctgtactt tcctcctaag caagaactca catccagctt 438  
 ctgcctcctc tgcaactccc agcactctcc tgctgactta caaataaatg ttcaagctgt 498

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 508

&lt;212&gt; DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (34).... (381)

&lt;213&gt; Homo sapiens

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of human endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 15

gcaggccac ctgtctgcaa cccagctgag gcc atg ccc tcc cca 45  
 Met Pro Ser Pro

I

ggg acc gtc tgc agc ctc ctg ctc ctc ggc atg ctc tgg ctg gac ttg 93



gcc atg gca ggc tcc agc ttc ctg agc cct gaa cac cag aga gtc cag 141  
 Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln  
 25 30 35  
 aga aag gag tcg aag aag cca cca gcc aag ctg cag ccc cga gct cta 189  
 Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu  
 40 45 50  
 gca ggc tgg ctg cgc ccg gaa gat gga ggt caa gca gaa ggg gca gag 237  
 Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala Glu Gly Ala Glu  
 55 60 65  
 gat gaa ctg gaa gtc cgg ttc aac gcc ccc ttt gat gtt gga atc aag 285  
 Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys  
 70 75 80  
 ctg tca ggg gtt cag tac cag cag cac agc cag gcc ctg ggg aag ttt 333  
 Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala Leu Gly Lys Phe  
 85 90 95 100  
 ctt cag gac atc ctc tgg gaa gag gcc aaa gag gcc cca gcc gac aag 381  
 Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp Lys  
 105 110 115  
 tgatcgccca caagccttac tcacctctct ctaagtttag aagcgctcat 431  
  
 ctggccttttc gcttgcttct gcagcaactc ccacgactgt tgtacaagct caggaggcga 491  
 ataaatgttc aaactgt 508

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa (pig)

&lt;400&gt;16

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys  
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg  
20 25

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa (pig)

&lt;223&gt; Amino acid sequence for porcine endogenous peptides (27 amino acid s) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;17

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu  
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg  
20 25

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa (pig)

&lt;223&gt; Amino acid sequence for prepro-form of porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 18

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Val Leu  
1 5 10 15

His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys  
 35 40 45  
 Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp Ser Gly  
 50 55 60  
 Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln His Gly  
 85 90 95  
 Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Thr  
 100 105 110  
 Glu Ala Pro Ala Asp Lys  
 115

<210> 19

<211> 117

<212> PRT

<213> Sus scrofa (pig)

<223> Amino acid sequence for prepro-form of porcine endogenous peptides  
 (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 19

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Val Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu  
 20 25 30  
 His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu  
 35 40 45  
 Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp Ser Gly Glu

Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Cys  
 65 70 75 80  
 Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln His Gly Gln  
 85 90 95  
 Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Thr Glu  
 100 105 110

Ala Pro Ala Asp Lys

115

<210> 20

<211> 494

<212> DNA

<220>

<221> CDS

<222> (9).... (362)

<213> Sus scrofa (pig)

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 20

ctgaggcc atg ccc tcc acg ggg acc att tgc agc ctg ctg ctc ctc 47  
 Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10  
 agc gtg ctc ctc atg gca gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttc ttg 95  
 Ser Val Leu Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu  
 15 20 25  
 agc ccc gaa cac cag aaa gtg cag cag aga aag gag tcc aag aag cca 143  
 Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
 30 35 40 45

acc acc acc ctg aag ccc cgg gcc cca acc agc tgg ttc tgc  
 Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu  
 50 55 60  
 gac agt ggt gag gtg gaa ggc acg gag gac aag ctg gaa atc cgg ttc 239  
 Asp Ser Gly Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe  
 65 70 75  
 aac gcc ccc tgt gat gtt ggg atc aag ttg tca ggg gct cag tcc gac 287  
 Asn Ala Pro Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp  
 80 85 90  
 cag cac ggc cag ccc ctg ggg aaa ttt ctc cag gac atc ctc tgg gaa 335  
 Gln His Gly Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu  
 95 100 105  
 gag gtc act gag gcc ccg gcc gac aag tgattgtccc tgagaccagc 382  
 Glu Val Thr Glu Ala Pro Ala Asp Lys  
 110 105

cacctctgtt ctcccagcct cctaagggct cacctggctt ccaggacgct tccactatca 442  
 caccagctc tgagggatgc tagcctggga ggtgaataaa cattcagact gg 494

<210> 21

<211> 491

<212> DNA

<220>

<221> CDS

<222> (9).... (359)

<213> Sus scrofa (pig)

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of porcine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 21

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10  
 agc gtg ctc ctc atg gca gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttc ttg 95  
 Ser Val Leu Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu  
 15 20 25  
 agc ccc gaa cac cag aaa gtg cag aga aag gag tcc aag aag cca gca 143  
 Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala  
 30 35 40 45  
 gcc aaa ctg aag ccc cgg gcc ctg gaa ggc tgg ctc ggc cca gaa gac 191  
 Ala Lys Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp  
 50 55 60  
 agt ggt gag gtg gaa ggc acg gag gac aag ctg gaa atc cgg ttc aac 239  
 Ser Gly Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn  
 65 70 75  
 gcc ccc tgt gat gtt ggg atc aag ttg tca ggg gct cag tcc gac cag 287  
 Ala Pro Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln  
 80 85 90  
 cac ggc cag ccc ctg ggg aaa ttt ctc cag gac atc ctc tgg gaa gag 335  
 His Gly Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu  
 95 100 105  
 gtc act gag gcc ccg gcc gac aag tgattgtccc tgagaccaggc 379  
 Val Thr Glu Ala Pro Ala Asp Lys  
 110 115  
 cacctctgtt ctcccagcct cctaagggtt cacctggctt ccaggacgct tccactatca 439  
 cacccagctc tgaggggatgc tagcctggga ggtgaataaaa cattcagact gg 491

&lt;210&gt; 22

<212> PRT

<213> Bos taurus

<223> Amino acid sequence for bovine endogenous peptides (27 amino acids)  
) of growth hormone secretagogue

<400> 22

Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Lys	Leu	Gln	Arg	Lys	Glu
1				5					10					15	
Ala	Lys	Lys	Pro	Ser	Gly	Arg	Leu	Lys	Pro	Arg					
			20					25							

<210> 23

<211> 89

<212> PRT

<213> Bos taurus

<223> Partial amino acid sequence for a prepro-form of bovine endogenous  
peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 23

Asp	Leu	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Glu
1				5					10					15	
Leu	Gln	Arg	Lys	Glu	Ala	Lys	Lys	Pro	Ser	Gly	Arg	Leu	Lys	Pro	Arg
			20					25					30		
Thr	Leu	Glu	Gly	Gln	Phe	Asp	Phe	Glu	Val	Gly	Ser	Gln	Ala	Glu	Gly
		35					40					45			
Ala	Glu	Asp	Glu	Leu	Glu	Ile	Arg	Phe	Asn	Ala	Phe	Phe	Asn	Ile	Gly
		50				55					60				
Ile	Lys	Leu	Ala	Gly	Ala	Gln	Ser	Leu	Gln	His	Gly	Gln	Thr	Leu	Gly
		65			70					75				80	
Lys	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu							

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 267

&lt;212&gt; DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).....(267)

&lt;213&gt; Bos taurus

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of bovine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 24

```

gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttt ctg agc ccc gaa cat cag gaa      48
Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu
   1               5               10               15
ctg cag aga aag gaa gct aag aag cca tca ggc aga ctg aag ccc cgg      96
Leu Gln Arg Lys Glu Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg
           20               25               30
acc ctg gaa ggc cag ttt gac ccg gag gtg gga agt cag gcg gaa ggt     144
Thr Leu Glu Gly Gln Phe Asp Phe Glu Val Gly Ser Gln Ala Glu Gly
           35               40               45
gca gag gac gag ctg gaa atc cgg ttc aac gcc ccc ttt aac att ggg     192
Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Phe Phe Asn Ile Gly
           50               55               60
atc aag cta gca ggg gct cag tcc ctc cag cat ggc cag acg ttg ggg     240
Ile Lys Leu Ala Gly Ala Gln Ser Leu Gln His Gly Gln Thr Leu Gly
           65               70               75               80
aag ttt ctt cag gac atc ctc tgg gaa
Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu

```

267



## 【図面の簡単な説明】

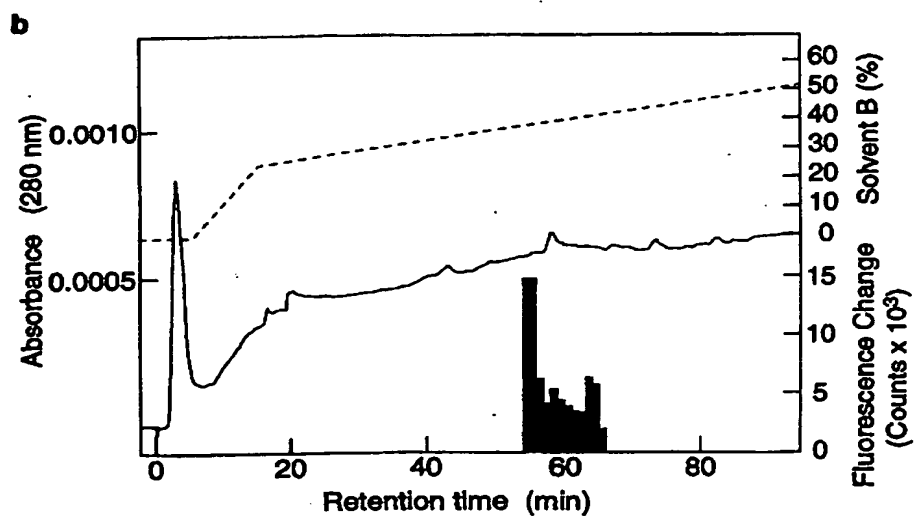
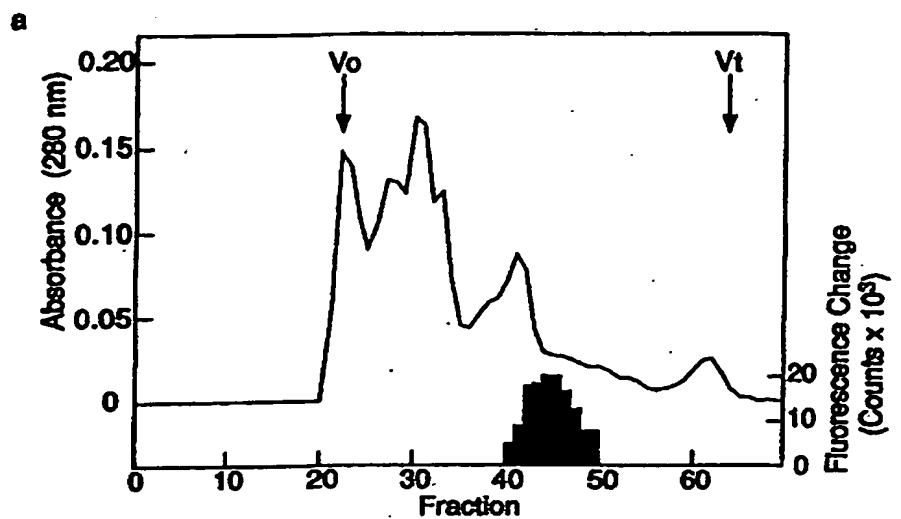
【図 1】 図1は、グレリンのラット胃抽出物からの精製を示す図で、CHO-GHSR62細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の上昇による蛍光強度の変化は黒棒で示してある。aは、40 gラット胃より調製したSP-III画分のSepahdex G-50 (fine) によるゲル濾過の結果を示す図で、活性画分が分子量約3,000ダルトンであることを示している。bは、2回目のCM-イオン交換HPLCの結果を示す図で、55?56分に溶出される活性画分は、逆相HPLCでさらに精製した。

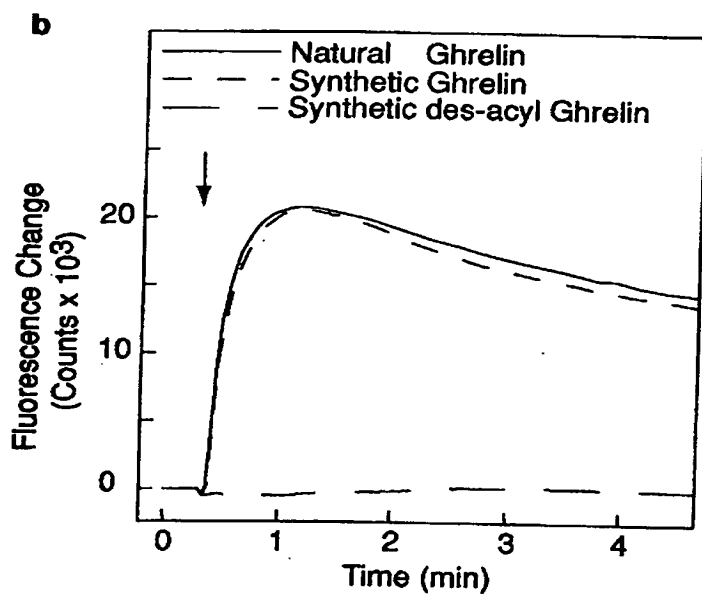
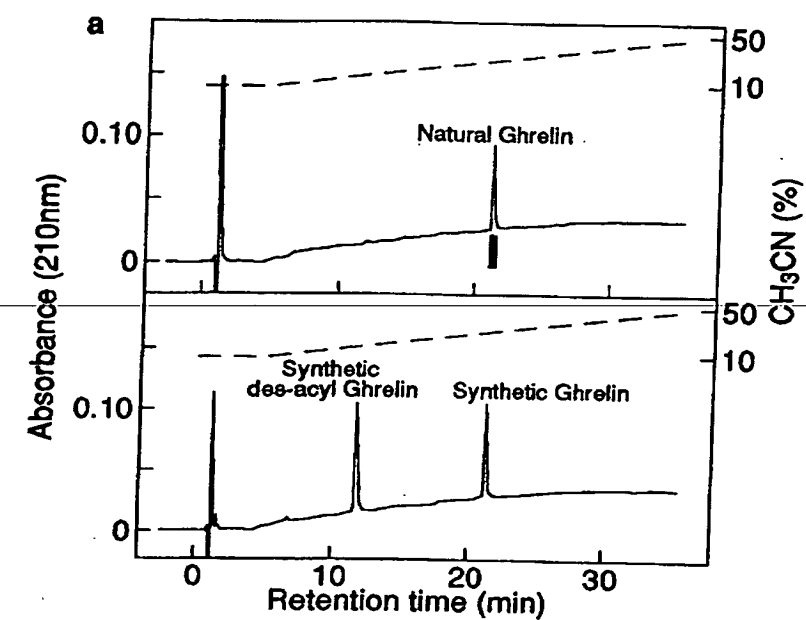
【図 2】 図2は、グレリンにおけるn-オクタノイル修飾を同定したことを示す。aは、天然型グレリン（上段）、及び合成グレリンと合成脱アシル化グレリン（下段）、各々2  $\mu$ gを逆相HPLCで分析した結果を示す図である。bは、天然型グレリン（実線）、合成グレリン（小破線）及び合成脱アシル化グレリン（大破線）による、CHO-GHSR62細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示す図である。

【図 3】 図3は、グレリンのCHO-GHSR62細胞に対する特異的な相互作用を示す図で、図中、矢印で示した点で試料を添加した。aは、グレリン、GHRP-6およびGRF（GHRH）によるCHO-GHSR62細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示した図である。bは、GHS-Rの特異的阻害剤である[D-Lys-3]-GRP-6を添加（○）あるいは非添加（●）時の、グレリンによるCHO-GHSR62細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示した図で、GRF（GHRH）による細胞内カルシウムイオン濃度の変化（黒三角）も示してある。

【図 4】 図4は、ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列、およびこれら前駆体の各種組織での発現を調べた結果を示す図である。aは、ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列を比較した図で、図中、同一アミノ酸は網掛け、点線はシグナルペプチド、黒三角はシグナルペプチドの切断点、三角はカルボキシル末端側の切断点、ボックスは成熟型グレリン部分、\*はn-オクタン酸による修飾を示す。bは、ラット各種組織におけるグレリンの発現をノザンプロットによって解析した結果を示す図である。

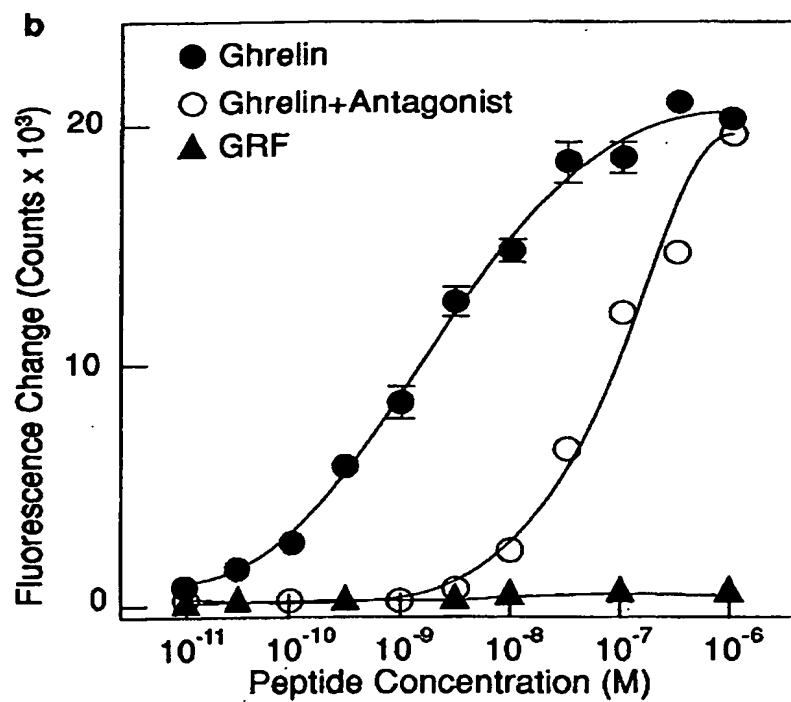
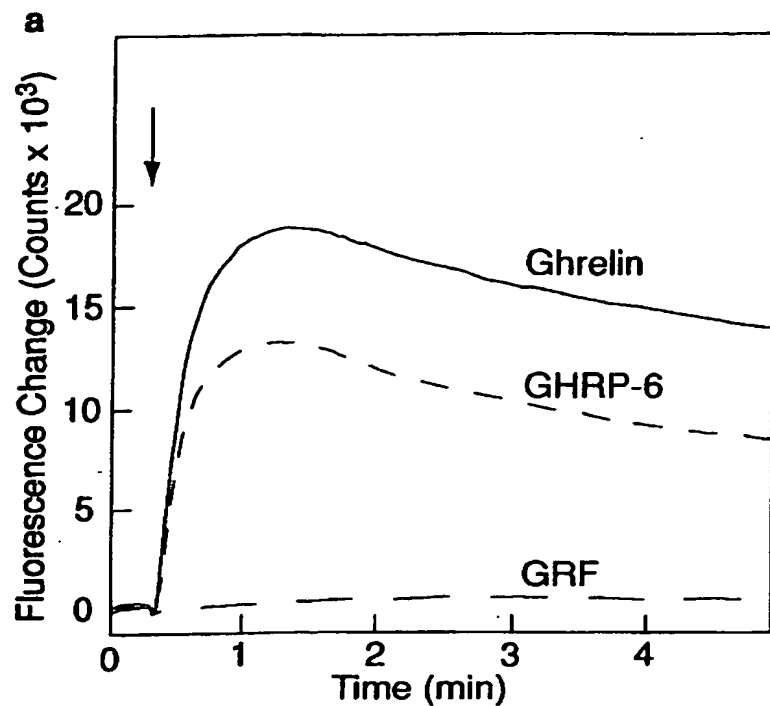
図aは、*in vitro*および*in vivo*におけるグレリンの下垂体ホルモンの分泌に及ぼす効果を示す図である。bは、ラット下垂体初期培養細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化による蛍光強度の変化を示した図で、実線はグレリン、破線は脱アシル化グレリンを添加した場合を示す。bは、グレリンによる下垂体ホルモンの分泌を示す図で、図中、黒棒はグレリン添加時、白棒はグレリン非添加時の下垂体ホルモン濃度を示す。cは、雄ラットにグレリンを静脈注射した後の血漿中の下垂体ホルモン濃度の経時変化を示す図である。図bおよび図c中で、GHは成長ホルモン、ACTHはアドレノコルティコトロピン、FSHはフォリクル、LHはルテナイジングホルモン、PRLはプロラクチン、TSHはチロイド促進ホルモンを表わす。





c

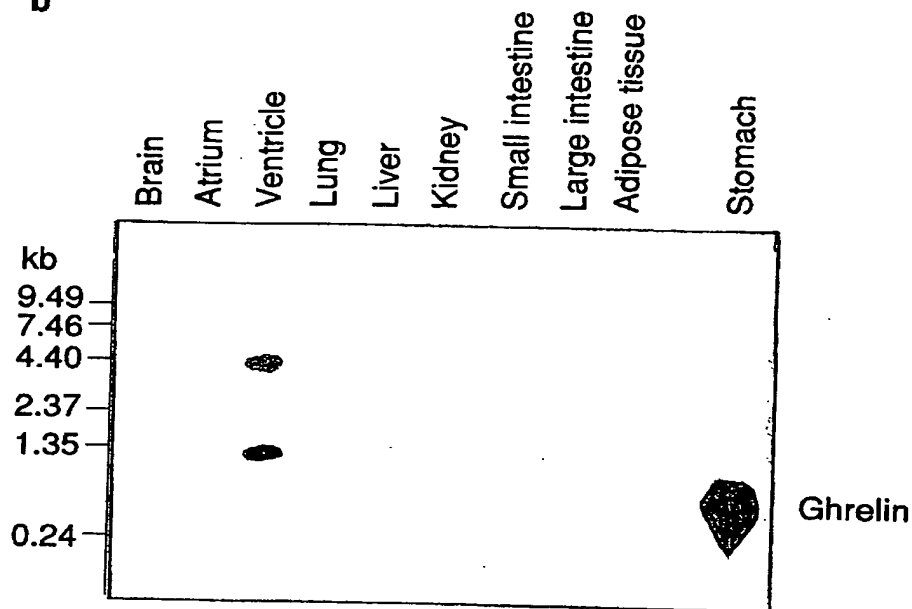


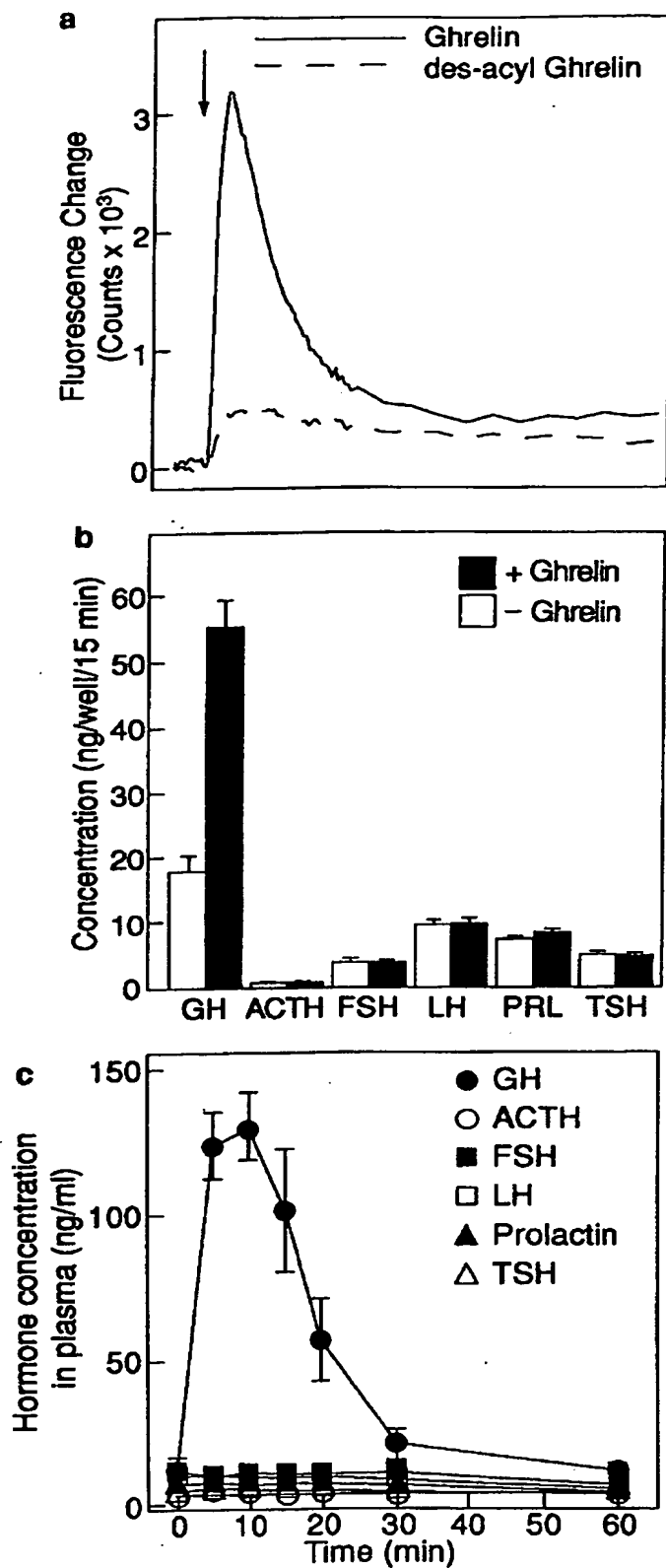


a

Human	1	MPSPGTVCSLLLLGMLWDLAMAGSSFLSP	30
Rat	1	MVSSATICSLLLLSMLWMDMAMAGSSFLSP	30
Human	31	EHQRVQQRKESKKPPAKLOPRALAGWLRPE	60
Rat	31	EHQKAQQRKESKKPPAKLOPRALEGWLHPE	60
Human	61	DGGQAEGAEDELEVRFNAPFDVGIKLSGVQ	90
Rat	61	DRGQAEEAEEEELEIRFNAPFDVGIKLSGAQ	90
Human	91	YQQHSQALGKFLQDILWEEAKEAPADK	117
Rat	91	YQQHGRALGKFLQDILWEEVKEAPANK	117

b





【課題】 成長ホルモンの分泌を誘導する新規ペプチド系化合物を提供する。

【解決手段】 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくとも一つのアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【選択図】 なし



【整理番号】 DS03J105

【提出日】 平成12年 5月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第338841号

【補正をする者】

【識別番号】 593081475

【氏名又は名称】 寒川 賢治

【代理人】

【識別番号】 100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【電話番号】 06-4796-1300

【発送番号】 028300

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 提出物件の目録

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 委任状 1

【ブルーフの要否】 要

5 9 3 0 8 1 4 7 5

19990806

住所変更

5 9 9 1 0 4 0 9 3

大阪府箕面市小野原東6丁目28、4-201号

寒川 賢治

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**